

Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências Biológicas

Departamento de Botânica

Laboratório de Ficologia

**ASPECTOS TAXONÔMICOS E MOLECULARES DE
HAPALIDIACEAE (CORALLINALES, RHODOPHYTA)
PARA ILHAS COSTEIRAS DO SUL E SUDESTE DO
BRASIL**

Marina Nasri Sissini

Florianópolis

2011

Marina Nasri Sissini

**ASPECTOS TAXONÔMICOS E MOLECULARES DE
HAPALIDIACEAE (CORALLINALES, RHODOPHYTA) PARA ILHAS
COSTEIRAS DO SUL E SUDESTE DO BRASIL**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado na disciplina Estágio II
(BIO 7016), como requisito parcial
para obtenção do grau de bacharel
em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de Santa
Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Antunes Horta Junior

Co-orientadora: Prof^ª Dra. Mariana Cabral de Oliveira

Florianópolis

2011

Aos meus queridos pais,

Luiz e Leyla.

“Essa busca inútil por ondas é como um antídoto para a maluquice evolucionária do ser humano. Viagens de barco e ilhas desertas. Mares abertos e caldos longos e escuros... Temos nossos próprios centros de reabilitação. Lugares pacíficos. O futuro nunca nos encontra. Nas grandes cidades do mundo, milhões de pessoas estão olhando para seus celulares, tentando se conectar. Aqui na água, já estamos conectados.”

Myers 2011

Agradecimentos

Agradeço à minha família por seu amor incondicional: à minha mãe Leyla, minha fortaleza e exemplo de vida; ao meu pai Luiz, companheiro de grandes aventuras; ao meu irmão Vinicius, se não fosse por ele, talvez eu nem estivesse por aqui... Sou eternamente grata por estarem sempre ao meu lado, onde quer que eu esteja.

Agradeço ao mestre, professor, amigo e orientador Paulo Horta por ter compartilhado o “chocantérrimo” mundo das algas calcárias. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos de todos esses anos, pelo seu bom humor inesgotante e por instigar, todos os dias, nossa admiração pelas coisas simples da vida...

Ao pessoal do LAFIC pela disposição em ajudar, pelas conversas na hora do café e por terem contribuído de uma forma ou de outra com este trabalho. Meu muito obrigado aos de agora e aos que já foram: Talita Vieira, Eduardo Bastos, Cintia Martins, Paola Sanches, Manuela Batista, Noele Arantes, Carol Faveri, Anaclara Pincelli, Jéssica Niehues, Eduardo Valduga, Debora Cabral, Julyana Farias, Ticiane Rover e Fernando Scherner. Às minhas pupilas: Jéssica e Aninha um suuuper obrigado pela imensa ajuda nestes últimos meses!

Agradeço à Prof^a Mariana Cabral de Oliveira por ter aceitado me co-orientar neste trabalho e por tamanha atenção durante minha empreitada biomolecular. Estendo meus agradecimentos aos amigos biomolengas do LAM: Fábio Nauer, Bia Torrano, Carol Franco, Nati Guimarães, Amanda, Rosário, Cíntia Iha e Henrique pelos infinitos *helps* na bancada, pelos almoços no bobó, pelas horas do café, e pela disposição em ir coletar! Obrigada mesmo!

Agradeço ao apoio do ICMBIO durante as coletas, em especial a duas pessoas que tornaram as coletas na REBio do Arvoredo possíveis: Hellen Rocha e “Leonardo” Zago.

Meus agradecimentos aos amigos australianos, em especial ao Prof. Fred Gurgel, por me receber em seu laboratório e me auxiliar durante minha estada em Adelaide. Aos queridíssimos Bob Baldock, Carolyn Ricci, Chris Brodie *thank you so much!*

Deixo meu muito obrigado aos meus queridos amigos do Projeto Biodiversidade, meus agradecimentos pelos almoços no bosque e, pelas nossas alegres manhãs de terças-feiras na Casa: Prof^a Barbara Segal, Jú Corrêa, Malu, Fê Linhares, Daniel, Ari, Camilinha, Aninha e Sarah.

Agradeço ao Prof. Eurico Cabral de Oliveira pela amizade, pelas sempre enriquecedoras conversas, pelas remadas e por suas contações de causos mundo a fora.

À turma 06.2 que, cada um com seu jeitinho, fez desses cinco anos os mais divertidos: Mick, Bob, Mari, Abu, Xitão, Marietou, Bar, Primo, PV, Andressa, Conchinha, Miska, Renatinha, Pedro, Paola, Bruna, Elisa, Nay...

Aos amigos da vida, ora mais perto, ora mais longe, minha avatar - Cecil, Larissa Zanette, Juba Avila, Leticia Canut, Cássio e Anninha.

Lista de figuras

Introdução Geral

Figura 1. Distribuição mundial dos bancos de rodolitos	13
--	----

Capítulo I

Figura 1. Área de estudo	26
Figura 2-9. Área de estudo: ilhas costeiras do sul do Brasil	28
Figura 10. Filograma de distância para as sequências de UPA	43
Figura 11. Filograma de distância para as sequências de SSU rDNA	44

Capítulo II

Figura 1. Área de estudo	54
Figuras 2-5 Ilha do Arvoredo/SC	58
Figuras 6-8. Área de estudo: Ilha Queimada Grande/SP	58
Figuras 9-12. Aspectos vegetativos de <i>Mesophyllum erubescens</i>	61
Figuras 13-18. Aspectos reprodutivos de <i>Mesophyllum erubescens</i>	62
Figura 19. Filograma de distância para as sequências de UPA	63
Figura 20. Distribuição mundial de <i>Mesophyllum erubescens</i>	66

Lista de tabelas

Introdução Geral

Tabela 1. Espécies de algas calcárias incrustantes referidas para o Brasil	14
--	----

Capítulo I

Tabela 1. Exemplos coletados em ilhas costeiras próximas a Florianópolis	30
Tabela 2. Informações das amostras cujas sequências foram obtidas no <i>GenBank</i>	31
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> utilizados	36

Capítulo II

Tabela 1. Características diagnósticas para as três subfamílias de Hapalidiaceae	54
Tabela 2. Matriz de identidade entre as sequências de UPA	64
Tabela 3. Comparação das descrições mais recentes de <i>Mesophyllum erubescens</i>	67

Sumário

Lista de figuras	6
Lista de tabelas	7
Introdução Geral	10
Referências	18

Capítulo I - Diversidade de algas calcárias não articuladas da família Hapalidiaceae para ilhas costeiras do sul do Brasil

Resumo	23
1. Introdução	24
1.1. Histórico da família Hapalidiaceae	24
1.2. As Hapalidiaceae no Brasil e no mundo	24
2. Objetivos	25
2.1. Objetivos específicos	25
3. Material e métodos	26
3.1. Área de estudo	26
3.2. Material biológico	29
3.3. Estudo morfo-anatômico	32
3.3.1. Material para microscopia eletrônica de varredura	33
3.3.2. Material para microscopia de luz	33
3.4. Estudo molecular	34
3.4.1. Extração de DNA	34
3.4.2. Amplificação por reação em cadeia da polimerase e marcadores moleculares	35
3.4.2.1. UPA	35
3.4.2.2. SSU rDNA	36
3.4.3. Purificação e quantificação do produto de PCR	36
3.4.4. Sequenciamento e Precipitação	37
3.4.5. Montagem das sequências filogenéticas	37
4. Resultados	38
4.1. Análise morfológica	38

4.2. Análise molecular	41
5. Discussão	45
6. Considerações finais	47
Referências	48

Capítulo II - *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lemoine (Corallinales, Rhodophyta) em ilhas costeiras do sul e sudeste do Brasil - uma reavaliação utilizando aspectos morfológicos e moleculares

Resumo	53
1. Introdução	54
2. Objetivos	55
2.1. Objetivos específicos	56
3. Material e métodos	56
3.1. Área de estudo	56
3.2. Processamento das amostras	59
3.3. Estudo morfo-anatomico	59
3.4. Estudo molecular	59
4. Resultados	59
4.1. Estudo morfológico	59
4.2. Estudo molecular	63
5. Discussão	64
6. Considerações finais	68
Referências	69

Introdução Geral

As Rhodophyta, também conhecidas como algas vermelhas, são encontradas tanto em águas tropicais como em regiões de águas frias. Existem cerca de 6000 espécies, a maior parte de ambientes marinhos, sendo alguns poucos representantes de ambientes de água doce. O referido grupo apresenta cloroplastos com clorofila *a* e ficobilinas, e parede celular constituída por microfibrilas de celulose e uma matriz mucilaginosa de polissacarídeos sulfatados conhecidos como ágar ou carragenana.

Além disso, determinados grupos de algas vermelhas depositam carbonato de cálcio em suas paredes celulares. Dentre estes grupos encontramos as algas conhecidas popularmente como calcárias, que podem ser completamente calcificadas ou alternar segmentos calcificados e não calcificados. Este grupo pode ser ainda subdividido em dois subgrupos artificiais: algas calcárias articuladas e algas calcárias não articuladas. As calcárias articuladas possuem regiões não calcificadas (genículo) e intercaladas por regiões calcificadas (intergenículo). As calcárias não articuladas, não apresentam genículos, apresentam hábitos de vida variados, como formas ancoradas ou aderidas ao substrato, ou ainda, livres no fundo da plataforma continental de todos os oceanos (Broom *et al.* 2008). As formas que crescem desprendidas do substrato são chamadas de rodolitos, nódulos ou maërl e podem ocupar grandes áreas, constituindo bancos frequentemente associados a uma grande biodiversidade (Steller *et al.* 2003; Riul *et al.* 2009).

A classificação de algas calcárias vigente até pouco tempo atrás, seguia a proposta de Harvey *et al.* (2003), os quais baseados em uma combinação de dados morfológicos, anatômicos, bioquímicos, ultraestruturais e moleculares reconheciam três famílias pertencente à ordem Corallinales: Corallinaceae Lamouroux, Hapalidiaceae J. E. Gray e Sporolithaceae Verheij. Mais recentemente, sob uma perspectiva multigênica e morfológica, Le Gall *et al.* (2010) propuseram a transferência de Sporolithaceae para uma nova ordem, Sporolithales, com uma família, Sporolithaceae.

As algas calcárias não articuladas compreendem cerca de 1000 espécies e estão amplamente distribuídas em todos os oceanos (Foster 2001), desde regiões tropicais até regiões polares e encontram-se da zona entre marés até 268m de profundidade nas Bahamas (Littler *et al.* 1986). Caracterizam-se por depositar carbonato de cálcio na forma de calcita em

suas paredes celulares, mineral que chega a perfazer 90% do peso seco destas algas (Woelkerling *et al.* 1993; Oliveira 1997). Por esta característica, chamam atenção não apenas de ficólogos, mas também de paleontólogos e geólogos por estarem presentes em abundância nos depósitos calcários desde o Cretáceo (Littler 1972).

Estas algas são capazes de transformar fundos homogêneos de sedimento suave em substratos heterogêneos duros, criando habitat para numerosos organismos (Steller *et al.* 2003). Os rodolitos, em áreas tropicais, são essenciais na construção de recifes de corais, agindo como cimentadores, protegendo esse ecossistema contra a ação erosiva das ondas, possibilitando o desenvolvimento e manutenção desses ecossistemas.

Algas incrustantes são um dos organismos marinhos mais abundantes em substratos consolidados dentro da zona fótica (Oliveira 1996). No Brasil, se estendem por quase toda plataforma continental; Millimann & Amaral (1974) estimam que o estoque de algas calcárias seja da grandeza de 2.10^{11} toneladas métricas. O fato de esses organismos precipitarem grandes quantidades de CO_2 na forma de carbonatos levou Oliveira (1996) a alertar sobre sua importância no balanço global de CO_2 . O autor ainda ressalta o valor econômico destas algas, visadas para fabricação de fertilizantes, aditivos alimentícios e cal. No entanto, os bancos de rodolitos servem de substrato para o crescimento de outras algas, são o local de refúgio, reprodução e berçário para muitos invertebrados, crustáceos e peixes (Riul *et al.* 2009). Adicionalmente, as espécies de algas calcárias construtoras dos bancos de rodolitos apresentam taxas de crescimento relativamente pequenas, conferindo ao recurso que, eventualmente representa o grupo, a característica de não renovável (Wilson *et al.* 2004).

Histórico

O levantamento histórico feito por Horta (2002) dos estudos taxonômicos das algas calcárias não articuladas realizados no mundom menciona que no início do século XVIII estes organismos eram considerados por alguns autores como estalactites inorgânicas. Enquanto outros, como Tournefort (1719) e Ray (1724) (*apud* Horta 2002), as reconheceram como plantas pelo fato de serem fixas ao substrato, em analogia simplista às plantas terrestres. Ainda de acordo com o autor, Linnaeus, em 1767, baseado em sua natureza calcária e na existência de pequeninos poros (conceptáculos) inclui o grupo como membro dos corais hermatípicos, Hydrozoa, formadores de recifes. O conceito de que algas vermelhas calcárias

são corais permanece até 1837, quando Philippi (1837) demonstra pela primeira vez, de forma clara e definitiva, que os representantes das Nullipores (Hydrozoa) eram plantas, estabelecendo os gêneros *Lithothamnion* e *Lithophyllum* (*apud* Horta 2002).

Durante o século XX, muito se discutiu sobre quais características reprodutivas e vegetativas seriam taxonomicamente relevantes e filogeneticamente informativas. Embora a partir dos anos 60, levantamentos taxonômicos tenham sido feitos no mundo (Dawson 1960; Chamberlain 1983; Woelkerling & Campebel 1992; Woelkerling 1996), as algas calcárias ainda são pobremente conhecidas no Brasil (Horta 2000, 2002). As primeiras citações foram feitas por pesquisadores no século XIX, como Harvey (1847), Dickie (1874, 1875), Piccone (1886). Uma série de trabalhos foi feita com essas algas, no entanto, abordando mais aspectos geológicos/ecológicos a taxonômicos (Gherardi 1995; Testa 1997; Riul *et al.* 2009). Este fato está relacionado às particularidades das técnicas necessárias para seu estudo anatômico, o qual é fundamental para a descrição de características diagnósticas deste grupo (Horta 2000).

Biodiversidade de algas calcárias

Os bancos de rodolitos estão amplamente distribuídos em todos os oceanos. Bancos abundantes são relatados para o Mar Mediterrâneo, Golfo da Califórnia e Oceano Atlântico – desde a Noruega, Irlanda, Escócia, Canadá, incluindo Caribe e Brasil. Segundo Foster (2001), os maiores bancos de rodolitos ocorrem no litoral brasileiro, como mostra a figura 1.

A Ilha do Arvoredo é o limite sul de formação de bancos de rodolitos no Oceano Atlântico. Apesar de ser consenso de que a temperatura afete a distribuição de espécies em particular, esta, não controla a distribuição de rodolitos em geral, visto que estes são encontrados também no Oceano Ártico. No caso da sua distribuição austral, seu limitante pode estar relacionado à mudança no tipo de substrato.

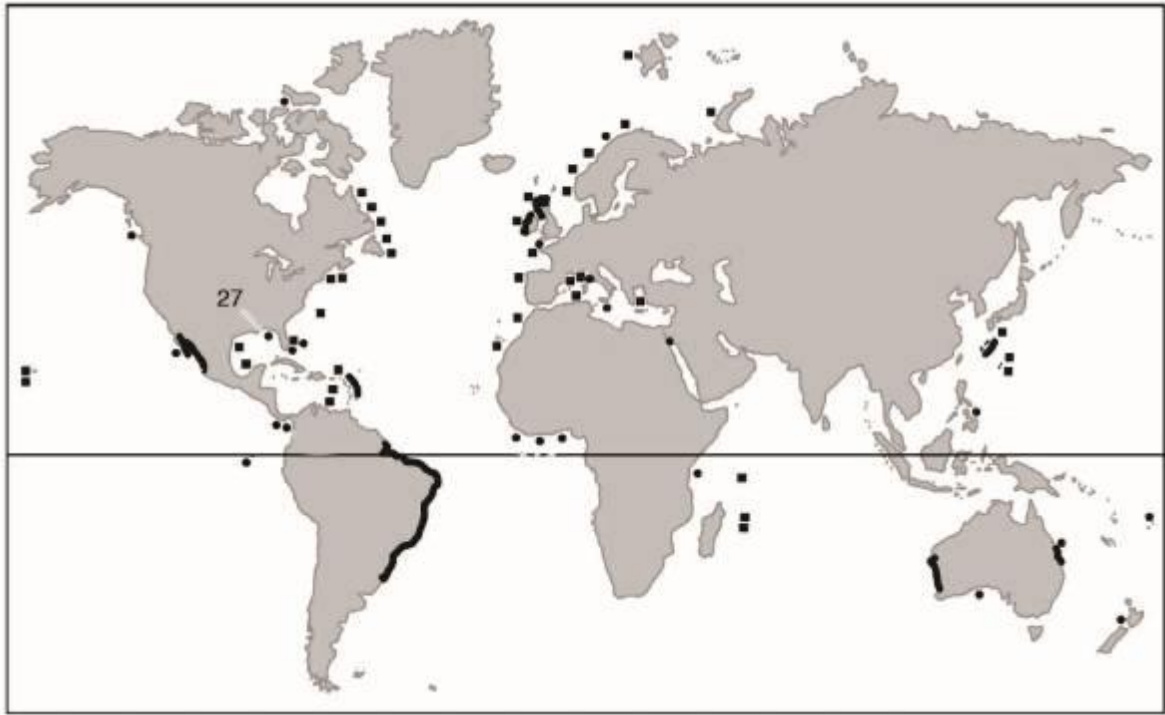


Figura 1. Distribuição mundial dos bancos de rodólitos, adaptado de Foster (2001). Os bancos são amplamente distribuídos. Note que embora sejam encontrados no Ártico, ainda não há registros de bancos para a Antártica.

A maior diversidade de algas calcárias incrustantes encontra-se no Pacífico e diminui à medida que se aproxima das regiões polares, em ambos os hemisférios (Steneck 1986). Até o presente estudo, são referidas 28 espécies de algas calcárias incrustantes para o Brasil, das quais sete possuem registro para o estado de Santa Catarina e, quatro foram tanto morfológicamente, como geneticamente caracterizadas no presente estudo. Os dados resumidos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Espécies de algas calcárias incrustantes referidas para o Brasil. As linhas sombreadas representam aquelas que foram revisadas, recentemente, segundo as técnicas e nomenclaturas modernas.

Espécies	Referências
Sporolithales	
Sporolithaceae	
<i>Sporolithon episporum</i>	Nunes <i>et al.</i> (2008), Burgos (2011)
<i>Sporolithon africanum</i>	Oliveira (1977)
<i>Sporolithon australasicum</i>	Oliveira (1977)
<i>Sporolithon dimotum</i>	Oliveira (1977)
<i>Sporolithum episporum</i>	Oliveira (1977)
<i>Sporolithon erythraeum</i>	Oliveira (1977)
<i>Sporolithon howei</i>	Oliveira (1977)
<i>Sporolithon mediterraneum</i>	Oliveira (1977)
<i>Sporolithon pacificum</i>	Oliveira (1977)
Corallinales	
Coralinaceae	
<i>Lithophyllum stictaeforme</i>	Nunes <i>et al.</i> (2008), Villas-Boas <i>et al.</i> (2009), Burgos (2011)
<i>Lithophyllum corallinae</i>	Villas-Boas <i>et al.</i> (2009)
<i>Lithophyllum johansenii</i>	Villas-Boas <i>et al.</i> (2009)
<i>Lithophyllum depressum</i>	Villas-Boas <i>et al.</i> (2009)
<i>Lithophyllum maragaritae**</i>	Vieira-Pinto (2011)
<i>Lithophyllum</i> sp.**	Vieira-Pinto (2011)
<i>Titanoderma bermudense**</i>	Horta (2000)
<i>Neogoniolithon mamillare</i>	Oliveira (1977)
<i>Neogoniolithon solubile</i>	Oliveira (1977)
<i>Pneophyllum fragile</i>	Oliveira (1977)
<i>Titanoderma pustulatum</i>	Oliveira (1977)
<i>Titanoderma pustulatum</i> var. <i>macrocarpum</i>	Horta (2000)
<i>Hydrolithon farinosum</i>	Horta (2000)
Hapalidiaceae	
<i>Mesophyllum erubescens**</i>	Nunes <i>et al.</i> (2008), Burgos (2011), Horta (2011)
<i>Mesophyllum engelhartii**</i>	Farias (2009)
<i>Lithothamnion superpositum*</i>	Farias <i>et al.</i> (2010)
<i>Lithothamnion brasiliense</i>	Horta (2000)
<i>Phymatholithon calcareum</i>	Horta (2000)
<i>Phymatholithon masonianum**</i>	Horta (2000)

* No presente trabalho é referenciado como *Lithothamnion crispatum*

**Espécies referenciadas para o estado de Santa Catarina

A biologia molecular como ferramenta taxonômica

A morfologia e a anatomia simples encontrada nas Rhodophyta, somadas à grande plasticidade fenotípica, presença de caracteres convergentes e alternância de gerações

heteromórficas no ciclo de vida, fazem da identificação e delimitação de espécies uma tarefa desafiadora (Saunders 2005). Além disso, as algas calcárias possuem uma densa deposição de carbonatos de cálcio na parede celular, o que demanda tratamentos específicos do material antes de se obter cortes histológicos para seu estudo morfoanatômico.

Além da grande variabilidade fenotípica relacionada a fatores geográficos, espaço/temporais e ambientais, a ausência de estruturas reprodutivas, principal caractere diagnóstico de gêneros e espécies, torna a taxonomia deste grupo, sem exageros, uma das mais problemáticas dentre as algas vermelhas. Por todas estas razões, tem-se buscado novas tecnologias para o estudo da sistemática do referido grupo.

O uso de ferramentas moleculares é uma alternativa e vem sendo cada vez mais utilizada, aliada a características morfoanatômicas, para determinar a posição sistemática de gêneros, espécies e subespécies (Vidal *et al.* 2003).

Nas últimas duas décadas, a biologia molecular tem auxiliado na identificação de espécies algais. Trabalhos utilizaram diversos marcadores moleculares (regiões específicas do DNA), exemplos incluem: espaçador interno transcrito dos genes ribossomais (ITS) (Tai *et al.* 2001), gene que codifica para a rubisco - ribulose bifosfato carboxilase oxigenase (*rbcL*) (Hughey *et al.* 2001), porções variáveis da região que transcreve para a subunidade grande do ribossomo (LSU) (Saunders & Lehmkuhl 2005). No entanto, a falta de universalidade na utilização de marcadores torna inviável a comparação de trabalhos. Saunders (2005) sugere, então, a padronização do uso de marcadores e propõe a região que transcreve para a subunidade I da citocromo oxidase (*cox1*) como uma ferramenta precisa e rápida na identificação de algas vermelhas, o *DNA barcoding*.

O *DNA barcode* é uma analogia aos códigos de barra dos produtos manufaturados e fundamenta-se na idéia de que existiria uma região no DNA que identificaria todos os organismos, assim como os códigos de barra identificam uma mercadoria no supermercado. Para ser um *DNA barcode* ideal, o marcador precisa, primeiramente, estar presente em todos os organismos, ser uma região curta, de fácil amplificação e ter *primers* universais. Estudos com grupos diversos de algas vermelhas corroboram com os resultados obtidos por Saunders (2005) para complexos de espécies das ordens Gigartinales e Rhodymeniales (Geraldino *et al.* 2006; Robba *et al.* 2006; Yang *et al.* 2007).

Outro candidato a *DNA barcode* em plantas em geral é o UPA (*Universal Plastid Amplicon*) (Presting (2006). Este marcador é uma região curta, com aproximadamente 410 pb, e de modo geral menos variável do que o *cox1*. Sherwood & Presting (2007) analisaram os níveis de divergência deste marcador molecular para 62 sequências de algas vermelhas, 19 de algas verdes, 14 de algas pardas, oito de cianobactérias, duas de diatomáceas, uma xantófita e uma euglenófita e, foi possível distinguir a maioria das espécies incluídas na análise. Tais características: região pequena, com *primers* universais, de fácil amplificação e presente nas linhagens fotossintetizantes, fortalece o UPA como candidato a *DNA barcode*.

Poucos trabalhos de biologia molecular abrangendo as algas calcárias não geniculadas foram publicados até hoje. Bailey & Chapman (1996, 1998) são os pioneiros no uso de sequências de DNA que transcrevem para a subunidade pequena do RNA ribossomal (SSU rDNA) para a reconstrução filogenética de algas calcárias. No trabalho de 1998, eles sugerem que a separação fenotípica das algas calcárias em duas categorias baseadas apenas na presença ou ausência de genículo, não refletem a história evolutiva do grupo. Os resultados indicam, pelo menos, quatro linhagens de algas calcárias: (1) as Sporolithaceae, (2) as Melobesioideae, (3) as Corallinoideae e outro grupo que inclui tanto membros geniculados quanto não geniculados.

Sob uma perspectiva mais taxonômica, Vidal *et al.* (2003) também utilizam um fragmento do SSU rDNA (600 pares de base) para identificar representantes de Corallinales do Chile e concluem que são efetivas na identificação de todas as amostras a nível genérico, e em alguns casos a nível de espécie. Sugerem ainda a utilização de marcadores menos conservados. Em um trabalho posterior, estes mesmos autores, incluem a região espaçadora *cox2-3* na identificação de *Spongites* para exemplares coletados no Chile (Vidal *et al.* 2008).

Pelo fato dos estudos anteriores de biologia molecular de algas calcárias terem mostrado que o gene SSU rDNA possui uma baixa variação interespecífica para espécies próximas, Broom *et al.* (2008) obtiveram, adicionalmente às sequências de SSU, sequências de *psbA* (gene que codifica para a proteína D1 do fotossistema II) para espécimes da Nova Zelândia, que se mostraram aparentemente eficazes na reconstrução filogenética do grupo em estudo.

O presente trabalho faz parte de um projeto maior e teve como objetivo contribuir para o conhecimento da biodiversidade de algas calcárias de Hapalidiaceae (Corallinales, Rhodophyta) de ilhas costeiras do sul do Brasil. Os resultados são apresentados em dois capítulos, o primeiro retratando a diversidade de Hapalidiaceae para quatro ilhas do sul do Brasil, a partir das análises de dados morfo-anatômicos e moleculares. A partir do registro de *Mesophyllum erubescens* para o sul do Brasil, esta espécie é reavaliada e sua ocorrência na região sudeste é ampliada no capítulo II, onde os resultados são discutidos sob uma perspectiva morfo-molecular.

Referências

- Bailey, J. C. & Chapman, R. L. 1996. Evolutionary relationships among coralline red algae (Corallinaceae, Rhodophyta) inferred from 1 8S rRNA gene sequence analysis. *In: Chaudhary, B. R.; Agrawal, S. B. [Eds.] Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae*. Academic Publishing, Amsterdam pp.363–76.
- Bailey, J.C. & Chapman, R.L. 1998. A phylogenetic study of the Corallinales (Rhodophyta) based on nuclear small-subunit rRNA gene sequences. *Journal of Phycology* 34: 692-705.
- Broom, J.E.S.; Hart, D.R.; Farr, T.J.; Nelson, W.A.; Neil, K.F.; Harvey, A.S. & Woelkerling, W.J. 2008. Utility of psbA and nSSU for phylogenetic reconstruction in the Corallinales based on New Zealand taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 958- 973.
- Chamberlain, Y.M. 1983. Studies in the Corallinaceae with special reference to Fosliella and Pneophyllum in the British Isles. *Bulletin of British Museum (Natural History) Botany Series* 11: 291-463.
- Dawson, E.Y. 1960. New records of marine algae from Pacific Mexico and Central America. *Pacific Naturalist* 1:31-52.
- Dickie, G. 1874. Enumeration of algae collected at Fernando de Noronha. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 14: 363-365.
- Dickie, G. 1875. Enumeration of algae collected from Bahia, collected by H.N. Mosely, M.A. naturalist, to H.M.S. "Challenger". *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 14: 377
- Foster, M.S. 2001. Rhodoliths: Between rocks and soft places. *Journal of Phycology* 37: 659-667.
- Geraldino, P. J. L.; Yang, E. C. & Boo, S. M. 2006. Morphology and Molecular Phylogeny of Hypnea flexicaulis (Gigartinales, Rhodophyta) from Korea. *Algae* 21: 417-423.
- Gherardi, D.M. 1995. A windward coralline algal ridge on Rocas Atoll, Atlantic Ocean. *Coral Reefs* 14: 34.

Harvey, W.H. 1847 Corallineae. *Phycol. Britannica*. 1: 124

Harvey, A.S.; Broadwater, S.T.; Woelkerling W.J. & Mitrovski, P.J. 2003. Choreonema (Corallinales, Rhodophyta): 18S rDNA phylogeny and resurrection of the Hapaladiaceae for the subfamilies Choreonematoideae, Austrolithoideae and Melobesioideae. *Journal of Phycology* 39: 988–998.

Horta, P.A. 2000. Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil: Taxonomia e Biogeografia. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Horta, P.A. 2002. Bases para a identificação das coralináceas não articuladas do litoral brasileiro – uma síntese do conhecimento. *Biotemas* 15: 7-44.

Hughey, J. R.; Silva, P. C. & Hommersand, M. H. 2001. Solving taxonomic and nomenclatural problems in Pacific Gigartinaceae (Rhodophyta) using DNA from type material. *Journal of Phycology* 37: 1091–1109.

Le Gall, L.; Payri, C.E.; Bittner, L. & Saunders, G.W. 2010. Multigene phylogenetic analyses support recognition of the Sporolithales ord. nov. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 302-305.

Littler, M.M. 1972. The crustose Corallinaceae. *Oceanography and Marine Biology - an Annual Review* 10: 311-347.

Littler, M.M.; Littler, D.S.; Blair, S.M. & Norris, J.N. 1986. Deep-water plant communities from an uncharted seamount off San Salvador Island, Bahamas: distribution, abundance, and primary productivity. *Deep-sea Research* 33: 881-892.

Milliman, J.D. & Amaral, C.A.B. 1974. Economic potential of Brazilian continental margin sediments. *Anais do Congresso Brasileiro de Geógrafos* 28: 335-344.

Oliveira, E.C. 1996. Is there a relation among the global warming, the missing carbon and the calcareous algae? *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 68 (supl.1): 18-21.

Oliveira, E.C. 1997. Letters. *Science* 277: 1991.

Piccone, A. 1886. Nota sulle raccolte algologiche fatte durante il viaggio di circumnavigazione della “Vettor Pisani” *Notarisia* 3: 150-151.

- Presting, G. G. 2006. Identification of conserved regions in the plastid genome – implications for DNA barcoding and biological function. *Canadian Journal of Botany* 84: 1434-43.
- Robba, L.; Russell, S. J.; Barker, G. L.; Brodie, J. 2006. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *American Journal of Botany* 93: 1101-1108.
- Riul P.; Lacouth P.; Pagliosa P. R.; Christoffersen M. L. & Horta P. A. 2009. Rhodolith beds at the easternmost extreme of South America: Community structure of an endangered environment. *Aquatic Botany* 90: 315-320.
- Saunders, G.W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of The Royal Society* 360:1879-1888.
- Saunders, G.W. & Lehmkuhl, K.V. 2005. Molecular divergence and morphological diversity among four cryptic species of *Plocamium* (Plocamiales, Florideophyceae) in northern Europe. *European Journal of Phycology* 40: 293-312
- Steller, D.L.; Riosmena-Rodríguez R.; Foster M.S. & Roberts C. 2003. Rhodolith bed diversity in the Gulf of California: The importance of rhodolith structure and consequences of anthropogenic disturbances. *Aquatic Conservation Marine Freshwater. Ecosystems* 13: S5–S20.
- Steneck, R.S. 1986. The ecology of coralline algal crusts: convergent patterns and adaptive strategies. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 17: 273-303.
- Sherwood, A.R. & Presting, G.G. 2007. Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *Journal of Phycology* 43 – 605-608.
- Tai, V.; Lindstrom, S. C. & Saunders, G. W. 2001 Phylogeny of the Dumontiaceae (Gigartinales Rhodophyta) and associated families based on SSU rDNA and internal transcribed spacer sequence data. *Journal of Phycology* 37: 184–196.
- Testa, V. 1997. Crustose Corallines, macroalgae, herbivores and sediments: Complex interactions along productivity gradients. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium* 1: 737-742.

- Vidal, R.; Meneses, I. & Smith, M. 2003. Molecular genetic identification of crustose representatives of the order Corallinales (Rhodophyta) in Chile. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 404-419.
- Vidal, R.; Meneses, I. & Smith, M. 2008. Phylogeography of the genus *Spongites* (Corallinales, Rhodophyta) from Chile. *Journal of Phycology* 44: 173-182.
- Woelkerling, WJ. 1996. The order Corallinales. In: Womersley, H.B.S. (ed). *The marine Benthic Flora of Sothern Australia, Part IIIB*. Graphic Print Group, Adelaide, p. 146-323
- Woelkerling, W.J. & Campbell, S.J. 1992. An account of southern Australian spicies of *Lithophyllum* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Bulletin of British Museum (Natural History) Botany Series* 22: 1-107.
- Woelkerling, W.J.; Spencer, K.G. & West, J.A. 1993. Studies on selected Corallinaceae (Rhodophyta) and other algae in a defined marine culture medium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 67: 61-77
- Yang, E. C.; Kim, M. S.; Geraldino, P. J. L.; Sahoo, D.; Shin, J. A. & Boo, S. M. 2007. Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 20:161-168.

Capítulo I

Capítulo I - Diversidade de algas calcárias não articuladas de Hapalidiaceae para ilhas costeiras do sul do Brasil

Resumo

Hapalidiaceae compreende os táxons cujos tetrasporângios e bisporângios zonados se desenvolvem dentro de conceptáculos multiporados e produzem tampões apicais, impedindo a saída dos tetra/bisporângios, até que estejam maduros. No final da década de 90, os estudos deste grupo se intensificaram. Cinco espécies de algas calcárias não articuladas são descritas por Horta (2000) para o sul e sudeste do Brasil. O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento da diversidade das Hapalidiaceae, a partir de uma análise conjunta de dados morfo-anatômicos e moleculares. Foram obtidos exemplares para quatro ilhas costeiras de Santa Catarina: do Arvoredo, da Galé, das Aranhas e do Xavier. Na área estudada, foram identificados quatro morfotipos que apresentam características que conferem com o conceito de Hapalidiaceae: *Lithothamnion crispatum*, *Melobesioideae* sp.2, *Mesophyllum erubescens* e *Mesophyllum* sp.1. As análises provenientes das sequências de UPA e SSU corroboraram a caracterização morfológica dos espécimes. Tais marcadores, quando aliados às técnicas atuais de identificação, podem ser utilizados fortalecendo determinado posicionamento taxonômico.

Palavras-chave: *Lithothamnion*, *Mesophyllum*, SSU rDNA, UPA

1. Introdução

1.1. Histórico da família Hapalidiaceae

Gray (1864) propõe Hapalidiaceae, originalmente, para um único gênero, *Hapalidium* (Kützinger 1843), baseando-se apenas em *H. roseolum* Kützinger (1843). No entanto, sua caracterização superficial (fronde lisa, hialina, composta por células) não foi suficiente para que autores subsequentes reconhecessem a família.

Cerca de 120 anos depois, Chamberlain (1983) apresenta um estudo sobre as, então, Corallinaceae das Ilhas Britânicas e propõe que *H. roseolum* não pode ser distinguido de *Melobesia membranacea* (Esper) Lamouroux. Sendo assim, *Hapalidium* torna-se sinônimo heterotípico de *Melobesia*.

Woelkerling (1988) reconhece a legitimidade de Hapalidiaceae, podendo ser então utilizada para a família que inclua o gênero *Melobesia*, o que é recentemente adotado por Harvey *et al.* (2003a). Estes autores propõem o ressurgimento de Hapalidiaceae, com três subfamílias (Choreonematoideae, Austrolithoideae e Melobesioideae) a partir de uma ampla análise morfo-anatômica e fortalecida pela reconstrução filogenética do gene SSU rDNA.

Atualmente, Hapalidiaceae compreende os táxons cujos tetrasporângios e bisporângios zonados se desenvolvem dentro de conceptáculos multiporados e produzem plugues apicais, impedindo a saída dos tetra/bisporângios, até que estejam maduros (Harvey *et al.* 2003a, 2003b).

Hapalidiaceae no Brasil e no mundo

A diversidade de Hapalidiaceae é, relativamente, bem conhecida. Numa escala global, são referenciadas 178 espécies (Guiry & Guiry 2011). Segundo Wynne (2005), complementado pelos dados de Horta (2002), o Atlântico Ocidental apresenta 18 espécies, das quais, sete ocorrem no litoral brasileiro. Em uma revisão do material depositado no herbário de Foslíe, Woelkerling (1993), a referência de três melobesioideas para o Brasil é confirmada, *Lithothamnion brasiliense* Foslíe e *L. heteromorphum* Foslíe, ambas da região de São Sebastião, estado de São Paulo e, *Mesophyllum erubescens* (Foslíe) Adey para a Ilha Fernando de Noronha. Estes representam os esforços pioneiros de Foslíe (1900, 1901) de

caracterizar boa parte da diversidade das algas calcárias não articuladas de todo o planeta (Printz 1929).

No final da década de 90, os estudos deste grupo se intensificaram. Horta (2000) registrou a ocorrência de cinco espécies de algas calcárias não articuladas para o sul e sudeste do Brasil. Dentre as quais, três são representantes da família Hapalidiaceae: *Lithothamnion brasiliense*, *Phymatholithon calcareum* (Pallas) Adey et McKibbin e *Phymatholithon masonianum* Wilks et Woelkerling.

Motivados por Horta, uma série de estudos com novos registros despontam no cenário nacional: Nunes *et al.* (2008) registra a ocorrência de três espécies para o estado da Bahia, sendo uma melobesioidea (*Mesophyllum erubescens*); Farias *et al.* (2010) fazem um estudo minucioso de *Lithothamnion superpositum* para o litoral brasileiro e propõe a colocação de *L. heteromorphum* como sinônimo heterotípico de *L. superpositum*; Burgos (2011) registra três espécies de algas calcárias incrustantes para o Arquipélago Fernando de Noronha: *Mesophyllum erubescens*, *Sporolithon episporum* e *Lithophyllum stictaeforme*, destacando o fato de ter trabalhado com a localidade do material tipo de *M. erubescens*. Horta *et al.* (2011) reveem a descrição de *Mesophyllum erubescens* para o litoral sul do Brasil, a partir da reavaliação do material identificado por Taylor (1960) do Atlântico caribenho.

2. Objetivos

Realizar estudos taxonômicos e filogenéticos de espécies de algas calcárias de Hapalidiaceae a partir de caracteres morfológicos e análises filogenéticas.

2.1. Objetivos específicos

- Investigar a diversidade de algas calcárias não articuladas de Hapalidiaceae nas ilhas costeiras de Santa Catarina.
- Obter sequências de DNA para os marcadores moleculares: UPA e SSU rDNA.
- Fazer análises de agrupamento para UPA e filogenéticas usando o SSU rDNA.
- Avaliar a utilização do UPA como *DNA barcode* dentro das Hapalidiaceae.

3. Material e Métodos

3.1. Área de estudo

Os espécimes foram coletados, através de mergulho autônomo, nas Ilhas do Arvoredo ($27^{\circ}16'43.91''\text{S}$ $48^{\circ}22'29.64''\text{O}$), da Galé ($27^{\circ}10'846''\text{S}$ $48^{\circ}24'548''\text{O}$), do Xavier ($27^{\circ}36'33.10''\text{S}$ $48^{\circ}23'09.74''\text{O}$) e das Aranhas ($27^{\circ}29'12.12''\text{S}$ $48^{\circ}23'09,74''\text{O}$), na região sul do litoral brasileiro (figura 1).

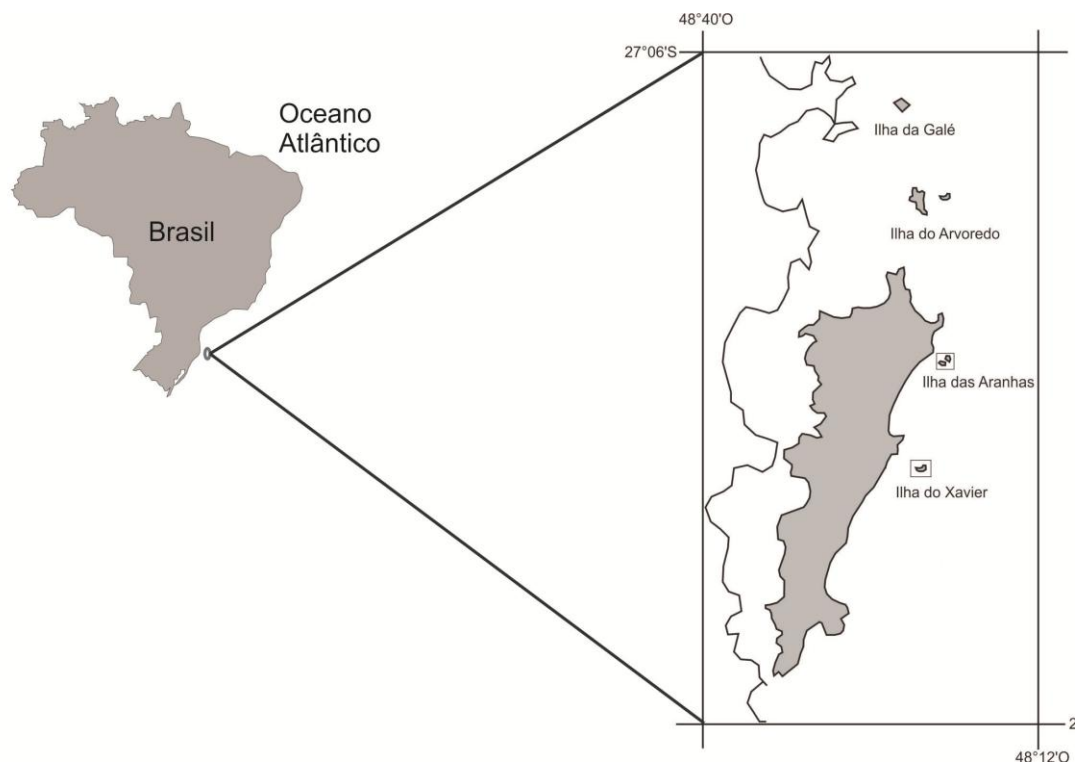


Figura 1. Área de estudo. Ilhas do Arvoredo e Galé, que pertencem à Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, e ilhas do Xavier e das Aranhas. Todas as quatro ilhas estão localizadas ao redor da Ilha de Santa Catarina.

A Ilha do Arvoredo, juntamente com a Ilha da Galé, Deserta e o Calhau de São Pedro, compõem a Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, localizada a 11 km ao norte da Ilha de Santa Catarina, cobrindo uma área de 17.600 hectares.

As coletas na Ilha do Arvoredo foram realizadas no banco de rodolitos situado na enseada do Rancho Norte. Este banco representa o limite sul de distribuição dos bancos de rodolitos na costa brasileira e é formado por formas livres de algas calcárias sobre um

substrato arenoso entre 7 e 20 metros de profundidade, recobrando uma área de, aproximadamente, 1000.000 m² (Gherardi 2004). Segundo o plano de manejo, esta área, assim como toda área da Ilha da Galé, é classificada como intangível, pois comporta uma grande heterogeneidade de habitats, logo, uma grande diversidade biológica.

A Ilha do Xavier está localizada a 4,5km de Florianópolis, circunvizinha à Praia Mole. É uma ilha de formação rochosa, constituindo paredões nos quais as algas calcárias são encontradas. Além disso, podem estar presentes também em pedaços de rocha soltas no fundo e em conchas vazias. As coletas foram realizadas no lado oeste da ilha, parte voltada para a Ilha de Florianópolis.

A Ilha das Aranhas é, na realidade, constituída por duas ilhas pequenas, a Aranha Grande e Pequena, posicionadas perpendicularmente uma a outra. Situa-se na costa leste, mais ao norte de Florianópolis, entre as praias do Moçambique e do Santinho. Sua formação geológica é muito parecida com a Ilha do Xavier, e as algas calcárias são encontradas incrustando pedaços de rochas soltas, conchas, raramente na forma de rodolitos.



Figuras 2-9 Área de estudo: ilhas costeiras do sul do Brasil. (2) Ilha do Arvoredo/SC. **(3)** Biodiversidade associada ao banco de rodolitos da Ilha do Arvoredo. **(4)** Ilha da Galé/SC, localizada dentro da REBio do Arvoredo, assim como a área amostrada na Ilha do Arvoredo. **(5) e (6)** Biodiversidade associada às algas calcárias não articuladas na Ilha do Xavier/SC. **(7)** Vista da Ilha do Xavier/SC. **(8)** Ilha das Aranhas. **(9)** Detalhe para a alga calcária incrustante e porífera na Ilha das Aranhas. (Fotos: 2, 5, 6, 7, 8 e 9 por Marina Sissini; foto 3 por Cecília Pascelli).

3.2. Material biológico

As amostras analisadas nesse trabalho estão listadas em duas tabelas: a tabela 1 inclui os materiais coletados para o presente estudo. Além disso, as análises foram enriquecidas com sequências do banco de dados *Genbank*, estas espécies estão listadas na tabela 2.

Em laboratório, as algas foram minuciosamente triadas, procurando retirar outras algas que, por ventura, a estivessem epifitando, assim como invertebrados e restos de material inorgânico, presentes tanto no interior, como nas protuberâncias das algas calcárias. Em seguida, foram passadas em água doce, secas com papel toalha e colocadas em frente ao ar condicionado para retirar o máximo possível da umidade.

Os espécimes foram armazenados de duas formas distintas, a fim de preservar o material para posteriores análises morfológicas e moleculares. O material destinado à análise morfo-anatômica foi fixado em formalina 4% diluída em água do mar. Enquanto que o material destinado à análise molecular foi transferido, individualmente, para um saco *zip* contendo sílica gel - para secagem final e armazenagem. Em ambos os processos de armazenamento, todos os espécimes foram identificados com: data, local de coleta, profundidade, nome do(s) coletor(es) e incorporado ao Herbário FLOR do Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina.

Tabela 1- Exemplos de algas calcárias de Hapalidiaceae coletadas em ilhas costeiras próximas a Florianópolis para os quais foram obtidas sequências de UPA e, para três deles, sequências de SSU rDNA.

Espécies	Informações de Coleta	Marcador(es) Molecular(es)
<i>Mesophyllum</i> sp.1 (MS#50)	Ilha das Aranhas, Santa Catarina, M. Sissini & E. Bastos, 1.02.2011	UPA
<i>Mesophyllum</i> sp.1 (MS#51)	Ilha das Aranhas, Santa Catarina, M. Sissini & E. Bastos, 1.02.2011	UPA
<i>Mesophyllum</i> sp.1 (MS#100)	Ilha da Galé, Santa Catarina, E. Bastos, 8.07.2010	UPA
<i>Mesophyllum</i> sp.1 (MS#14)	Ilha do Xavier, Santa Catarina, M. Sissini & E. Bastos, 4.12.2010	UPA
<i>Mesophyllum</i> sp.1 (MS#30)	Ilha do Xavier, Santa Catarina, M. Sissini, 18.01.2010	UPA e SSU
<i>Mesophyllum</i> sp.1 (MS#29)	Ilha do Xavier, Santa Catarina, M. Sissini, 18.01.2010	UPA e SSU
<i>Mesophyllum</i> sp.1 (MS#26)	Ilha do Xavier, Santa Catarina, M. Sissini, 18.01.2010	UPA
Melobesioideae sp. 2 (MS#32)	Ilha do Xavier, Santa Catarina, M. Sissini, 18.01.2010	UPA e SSU
<i>Lithothamnion crispatum</i> (MS#01)	Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, C. Pascelli & M. Sissini, 17.01.2011	UPA
<i>Mesophyllum erubescens</i> (MS#10)	Ilha do Arvoredo, Santa Catarina, C. Pascelli & M. Sissini, 17.01.2011	UPA

Tabela 2 - Informações das amostras cujas sequências foram obtidas no *GenBank* para enriquecer as análises dos marcadores moleculares.

Espécies	Informações de Coleta	Marcador Molecular	Nº acesso Genbank
<i>Phymatolithon</i> sp.	Oahu, Havaí Sherwood <i>et al.</i> 2010	UPA	HQ421548
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Havaí Sherwood <i>et al.</i> 2010	UPA	HQ420979
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Havaí Sherwood <i>et al.</i> 2010	UPA	HQ420974
<i>Pneophyllum conicum</i>	Havaí Sherwood <i>et al.</i> 2010	UPA	HQ421556
<i>Sporolithon ptychoides</i>	Havaí Sherwood <i>et al.</i> 2010	UPA	HQ421547
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Nova Zelândia Broom <i>et al.</i> 2008	SSU	EF628221
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Nova Zelândia Broom <i>et al.</i> 2008	SSU	EF628219
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Oahu, Havaí James, S.A. 2006	SSU	DQ629012
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Lanai, Havaí James, S.A. 2006	SSU	DQ629011
<i>Mesophyllum engelhartii</i>	África do Sul Bailey, J.C. & Chapman, R.L. 1996	SSU	U61256
<i>Mesophyllum erubescens</i>	Brasil Bailey, J.C. & Chapman, R.L. 1996	SSU	U61257
<i>Mesophyllum printzianum</i>	Nova Zelândia Broom <i>et al.</i> 2008	SSU	EF628224
<i>Mesophyllum sphaericum</i>	Galicia, Espanha Pena <i>et al.</i> 2011	SSU	HQ322411

Tabela 2 - Informações das amostras cujas sequências foram obtidas no *GenBank* para enriquecer as análises dos marcadores moleculares (Continuação)

Espécies	Informações de Coleta	Marcador Molecular	Nº acesso Genbank
<i>Mesophyllum sphaericum</i>	Galicia, Espanha Pena <i>et al.</i> 2011	SSU	HQ322412
<i>Mesophyllum lichenoides</i>	Galicia, Espanha Pena <i>et al.</i> 2011	SSU	HQ322410
<i>Synarthrophyton schielianum</i>	Nova Zelândia Broom <i>et al.</i> 2008	SSU	EF628217
<i>Lithothamnion</i> sp.	Oahu, Havaí James, S.A. 2006	SSU	DQ629010
<i>Lithothamnion tophiforme</i>	Labrador, Canada Bailey, J.C. & Chapman, R.L. 1996	SSU	U60739
<i>Phymatolithon laevigatum</i>	Dorset, UK Bailey, J.C. & Chapman, R.L. 1996	SSU	U60740
<i>Phymatolithon lenormandii</i>	Dorset, UK Bailey, J.C. & Chapman, R.L. 1996	SSU	U60741
<i>Sporolithon ptychoides</i>	Oahu, Havaí James, S.A. 2006	SSU	DQ629013

3.3. Estudo morfo-anatômico

As lâminas permanentes e os suportes de alumínio (*stubs*) utilizados para a observação em microscopia de luz e microscopia eletrônica, respectivamente, foram preparados de acordo com os procedimentos apresentados por Horta (2002).

A análise morfológica das plantas foi feita com base nos seguintes caracteres vegetativos e reprodutivos:

I. Caracteres vegetativos:

1. Hábito, cor e textura dos talos.
2. Tipo de fixação ao substrato.
3. Forma, comprimento e diâmetro das células epiteliais, subepiteliais, do peritalo e do hipotalo.
4. Ausência de conexões secundárias entre as células de filamentos adjacentes.
5. Presença de fusões celulares entre células de filamentos adjacentes.

II. Caracteres reprodutivos:

1. Forma, comprimento e diâmetro dos conceptáculos tetrasporangiais.
2. Número de células do filamento do teto do conceptáculo.
3. Número e forma das células que delimitam o canal do poro.

3.3.1. Material para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O material utilizado no MEV foi desidratado ao ar livre e observado na lupa para a seleção de regiões contendo conceptáculos e/ou margem de crescimento. As fraturas, em orientação perpendicular à superfície, foram colocadas sobre um suporte cilíndrico de alumínio (*stub*) cuja superfície é recoberta por uma fita de carbono. Como procedimento final de preparação do material, estes foram metalizados com ouro, num tempo de exposição de 60 segundos, a uma corrente de 50mA, no metalizador BALTEC CED 030. As imagens foram obtidas e analisadas no JEOL JSM-6390LV no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

3.3.2. Material para microscopia de luz

Para a observação em microscopia óptica, foram selecionadas regiões dos espécimes contendo conceptáculos e margens de crescimento e realizadas três etapas para a preparação do material: (a) descalcificação, (b) desidratação e infiltração e, (c) cortes histológicos e coloração.

a) Descalcificação

Para a descalcificação do material, os espécimes ficaram submersos em uma solução de ácido clorídrico 5% até não se observar mais a liberação de bolhas, substituindo a solução ácida até a descalcificação completa. O tempo de descalcificação variou conforme o tamanho do fragmento e a quantidade de carbonato de cálcio impregnado, variando de 4 a 24 horas.

b) Desidratação

Após a descalcificação o material foi desidratado gradualmente em soluções de 30, 50, 70, 90 e 100% de etanol, a intervalos de 40 minutos, para evitar que as estruturas celulares colapsassem. Em seguida, o material foi infiltrado por, no mínimo, 12 horas em solução de metacrilatoglicol e embocado segundo as instruções do fabricante (*Histo-resin embedding Kit* Leica, marca Reichert-Jung).

c) Cortes histológicos

Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo Leica RM 2125 RT, com navalha de aço, no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFSC. Os cortes variaram de 5-10µm de espessura e foram corados em azul de toluidina acidificado com ácido bórico (0,16g de toluidina: 1,6g de ácido bórico em 10ml de água destilada) (Horta 2002). Foram montadas lâminas permanentes para as análises em microscópio óptico.

3.4. Estudo molecular

O processamento das amostras para o estudo molecular foi realizado no Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula” da Universidade de São Paulo.

3.4.1. Extração de DNA

Para a extração do DNA, pequenos pedaços de alga calcária foram selecionados sob a lupa e triturados, com o auxílio de um almofariz e um pistilo, previamente congelados, em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A extração de DNA foi feita com o kit *NucleoSpin Plant II* (Macherey-Nagel), de acordo com o protocolo do fornecedor.

3.4.2. Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e marcadores moleculares

A reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) consiste na replicação de fragmentos de DNA de interesse a partir de, teoricamente, uma única molécula de DNA.

A escolha do marcador molecular difere conforme a finalidade de cada trabalho. Por exemplo, regiões de DNA com taxas de mutação mais elevadas são indicadas para separar grupos taxonômicos mais baixos - espécies e populações - enquanto regiões com menos acúmulo de mutações são indicadas para separar grupos taxonômicos mais elevados, como gêneros, famílias e ordens.

3.4.2.1. UPA

O UPA (*Universal Plastid Amplicon*), proposto como *DNA barcode* por Presting (2006), é uma região curta (aproximadamente 410 pb) presente nas linhagens fotossintetizantes. Além disso possui regiões conservadas que permitem o uso de *primers* universais. Tais características, permitem sua fácil amplificação e, fortalecem o UPA como candidato à *DNA barcode*.

Para um volume final de 50 µl, foram utilizados na reação de PCR: 32,75 µl de água, 1 µl de DNA total, 10 µl de tampão, 3 µl de MgCl₂, 1 µl de dNTP, 1 µl de cada par de *primer* (*forward* e *reverse* – as sequências dos *primers* estão na tabela 3) e 0,25 µl de Taq Polimerase (Invitrogen).

A reação foi realizada no termociclador Techne TC-512 (Analítica) com ciclo específico para o marcador molecular utilizado: dois minutos iniciais de resfriamento a 4°C; 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos para, respectivamente, desnaturação, anelamento com o primer e extensão das fitas de DNA e, por último, 10 minutos a 72°C para extensão final.

Tabela 3 - Sequência dos *primers* utilizados nas reações de amplificação e sequenciamento do SSU rDNA (em azul) e UPA (em roxo).

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
18S5' (<i>foward</i>)	5'- CAACCTGGTTGATCCTGCCAGT - 3'
536R (<i>reverse</i>)	5'- GAATTACCGCGGCTGCTG - 3'
530F (<i>foward</i>)	5' – GAGGGCAAGTCTGGTG - 3'
18S3' (<i>reverse</i>)	5' – GATCCTTCTGCAGGTTACCTACGGAA - 3'
1055F (<i>foward</i>)	5' - GGTGGTGCATGGCCG - 3'
1055R (<i>reverse</i>)	5' – CGGCCATGCACCACC - 3'
UPA-F (<i>foward</i>)	5' - GGACAGAAAGACCCTATGAA - 3'
UPA-R (<i>reverse</i>)	5' - TCAGCCTGTTATCCCTAGAG - 3'

3.4.2.2. SSU rDNA

O SSU rDNA codifica para o RNA da subunidade pequena do ribossomo e possui aproximadamente 1800 pares de bases (pb). Tal gene é uma região relativamente conservada do DNA e que tem sido utilizada para inferências filogenéticas em diferentes grupos de Rhodophyta (Bailey & Freshwater 1997). A amplificação deste gene foi feita, na maioria das amostras, por um par de primers (18S5' e 18S3') e em algumas outras, a amplificação foi dividida em duas partes: (1) 18S5' e 536R e (2) 530F e 18S3'. As sequências dos *primers* estão na tabela 3.

3.4.3. Purificação e quantificação do produto de PCR

Os produtos da PCR foram purificados em colunas *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) de acordo com o protocolo do fornecedor. A quantificação do produto de PCR foi feita no aparelho Nanodrop®. A concentração de DNA obtida foi importante para mensurar a quantidade de produto de PCR purificado a ser utilizado na reação de sequenciamento.

3.4.4. Sequenciamento e Precipitação

A reação de sequenciamento dos marcadores moleculares a partir do produto de PCR purificado e quantificado foi realizado no sequenciador automático (ABI PRISM 3100) usando-se o kit *BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* da Applied Biosystems segundo o protocolo do fornecedor. Para cada reação, foram utilizados: 2µl de tampão, 2µl de BygDye, valores variáveis de primer *foward* ou *reverse* (de acordo com a concentração), entre 1 e 7µl de produto de PCR purificado e a quantidade de água para completar um volume total de 10µl.

O ciclo utilizado na reação de sequenciamento foi: 40 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos, perfazendo um tempo total de 3 horas e 56 minutos.

3.4.5. Montagem das sequências e análises filogenéticas

Foram obtidas sequências nas direções direta e reversa. Usando o programa BioEdit (Hall, 1990), montou-se as sequências consenso para cada amostra sequenciada. As sequências consenso obtidas foram comparadas com as disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), através do programa BLAST (Altschul *et al.* 1997).

Tanto as sequências consenso, como as obtidas no banco de dados, foram alinhadas no Clustal-W, programa acoplado ao BioEdit. As árvores foram construídas usando o método de distância *neighbour-joining* (NJ) e máxima parsimônia (MP) para ambos marcadores. Os modelos evolutivos ótimos para as análises foram obtidos através do programa FindModel (disponível no site <http://www.hiv.lanl.gov>) e as árvores geradas no programa MEGA 4.0.2. Foram utilizadas 1000 réplicas (valor de *bootstrap*) para ambas as análises. Os valores de *bootstrap* referentes às análises de NJ estão acima dos ramos e em preto, e às de MP estão expressos abaixo e em laranja. A árvore é desenhada em escala, com os comprimentos dos ramos na mesma unidade das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética.

Nas árvores descritas foram plotados apenas os valores maiores que 50% para *bootstrap* e considerou-se a seguinte escala arbitrária para descrever as porcentagens de suporte:

- 50-69 suporte baixo;
- 70-85 suporte moderado e,
- 86-100 suporte alto.

4. Resultados

4.1. Análise morfológica

Na área estudada foram identificados quatro morfotipos pertencentes à Hapalidiaceae. Para dois deles, foi possível identificar até nível específico - *Mesophyllum erubescens* e *Lithothamnion crispatum* – vale ressaltar que ambas as espécies já haviam sido registradas para a localidade. Outro morfotipo foi identificado como *Mesophyllum* sp.1, mas não foi possível chegar ao nível específico a partir das características observadas. O quarto representante aparece no presente trabalho como Melobesioideae sp.2 pois mais estudos morfo-anatômicos são necessários para um posicionamento adequado na subfamília Melobesioideae.

Lithothamnion crispatum Hauck (1878:289)

BASINOMIO: *Lithothamnion crispatum*

HOLÓTIPO: TRH

LOCALIDADE TIPO: Rovinj, norte do Oceano Adriático

FIGURAS: Basso *et al.* 2010

SINÔNIMOS HOMOTÍPICOS

Lithophyllum crispatum (Hauck) Hauck 1885



Archaeolithothamnion crispatum (Hauck) Foslie 1898
Lithothamnion philippii f. *crispatum* (Hauck) Foslie 1904

SINÔNIMOS HETEROTÍPICOS

Lithothamnion brasilense f. *heteromorpha* Foslie 1900
Lithothamnion fruticosum f. *confinis* Foslie 1904
Lithothamnion heteromorphum (Foslie) Foslie 1907
Lithothamnion indicum Foslie 1907
Lithothamnion superpositum Foslie 1900
Mesophyllum superpositum (Foslie) Adey 1970

ETIMOLOGIA: *Lithothamnion*, do grego *lithos* (pedra) e *thamnion* (arbusto). *Crispatum* significa crespo ou enrugado, como o hábito das plantas do Mediterrâneo, descritas e ilustradas por Hauck.

DISTRIBUIÇÃO NO LITORAL BRASILEIRO: Bahia, Santa Catarina, São Paulo (Farias *et al.* 2010).

MATERIAL EXAMINADO: **BRASIL. Santa Catarina.** Ilha do Arvoredo, 17.i.2011, M. Sissini & C. Pascelli (FLOR).

DESCRIÇÃO E ILUSTRAÇÕES PARA O MATERIAL DE SANTA CATARINA: Farias *et al.* 2010.

COMENTÁRIOS: Cabioch & Mendoza (1998) fazem uma revisão do lectótipo de *L. crispatum*. Embora o material não esteja fértil, concluem que *L. crispatum* é coespecífico com *Lithothamnion philippii* f. *crispata*, e que *Lithothamnion philippii* Foslie pertence a outra espécie.

Cerca de dez anos depois, Basso *et al.* (2010) reavaliam o lectótipo e encontram um conceptáculo tetra/bisporangial vazio. Incluindo espécimes recentes coletados no mar Mediterrâneo, redescrevem *L. crispatum*, ampliando sua distribuição para os oceanos Atlântico e Índico e para a costa leste da Austrália. Neste mesmo trabalho, os autores propõem a coespecificidade de *Lithothamnion superpositum* com *L. crispatum*, incluindo o material de Farias *et al.* (2010). Logo, o material do presente estudo corresponde ao material descrito por Farias *et al.* (2010), *Lithothamnion superpositum* sinóníma de *L. crispatum*.

***Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lemoine 1928:252**

BASINOMIO: *Lithothamnion erubescens* Foslie 1900:9-10, Taylor (1960)

HOLÓTIPO: TRH

LOCALIDADE TIPO: Arquipélago Fernando de Noronha, Brasil

FIGURAS: Horta *et al.* 2011



SINÔNIMOS HOMOTÍPICOS

Lithothamnion erubescens Foslie 1900

SINÔNIMOS HETEROTÍPICOS

Lithothamnion erubescens f. *madagascarensis* Foslie 1901

Lithothamnion erubescens f. *haingsisianum* Weber-van Bosse & Foslie 1901

Lithothamnion erubescens f. *subflabellatum* Foslie 1904

Lithothamnion madagascarensis (Foslie) Foslie 1906

Lithothamnion patena f. *incisa* Foslie 1906

Lithothamnion incisum (Foslie) Foslie 1907

Mesophyllum incisum (Foslie) Adey 1970

Mesophyllum madagascarensis (Foslie) Adey 1970

Polyporilthon patena var. *incisa* (Foslie) Chapman & Parkinsn (1974)

ETIMOLOGIA: *Mesophyllum* vem do grego *mesos*, que significa meio e do grego latinizado *phyllon* (folha); provavelmente se referindo à hipótese de Lemoine (1928) de que as espécies de *Mesophyllum* apresentariam uma morfologia intermediária às de *Lithophyllum* e *Lithothamnion* (Woekerling 1988).

DISTRIBUIÇÃO NO LITORAL BRASILEIRO: Santa Catarina (Horta *et al.* 2011), Bahia (Figueiredo & Steneck 2002; Nunes *et al.* 2008) e Fernando de Noronha (Foslie 1900; Burgos 2011).

MATERIAL EXAMINADO: **BRASIL. Santa Catarina.** Ilha do Arvoredo, 17.i.2011, M. Sissini & C. Pascelli (FLOR); **São Paulo.** Ilha Queimada Grande, 19.iv.2011, M. Sissini & B. Torrano (FLOR).

DESCRIÇÃO E ILUSTRAÇÕES PARA O MATERIAL DE SANTA CATARINA: Horta *et al.* 2011

COMENTÁRIOS: Esta espécie será discutida no Capítulo II.

Mesophyllum sp.1

MATERIAL EXAMINADO: **BRASIL. Santa Catarina.** Ilha do Xavier, 18.i.2010, M. Sissini (FLOR); Ilha da Galé, 8.vii.2010, E. Bastos (FLOR); Ilha das Aranhas, 1.ii.2011, M. Sissini & E. Bastos (FLOR).



COMENTÁRIOS: O material foi posicionado em *Mesophyllum* por apresentar células epiteliais de esféricas a achatadas, mas nunca em forma de taça; células subepiteliais mais longas do que as subjacentes. Margens evidenciando construção monômera. Quanto às estruturas reprodutivas, foram observados conceptáculos multiporados com tetrasporângios. Plantas gametofíticas não foram observadas.

Melobesioideae sp.2

MATERIAL EXAMINADO: **BRASIL. Santa Catarina.** Ilha do Xavier, 18.i.2010, 4.xii.2010, M. Sissini & E. Bastos (FLOR).



COMENTÁRIOS: O material analisado confere com os conceitos de Hapalidiaceae e da subfamília Melobesioideae (Harvey *et al.* 2003b). Para um posicionamento mais preciso dentro das melobesioideas, o material carece de uma análise mais detalhada.

4.2. Análise Molecular

4.2.1. Análise do UPA

Foram obtidas 10 sequências para UPA no presente estudo. A razão de variação entre os sítios foi modelada a partir da distribuição gama (parâmetro = 0,09417). Ao todo, foram

analisadas 370 posições (pb), sendo 70 variáveis. As sequências de *Pneophyllum conicum* e *Sporolithon ptycoides* foram utilizadas como grupo externo. A figura 10 mostra a árvore consenso de distância (*Neighbour-joining* - NJ). Os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) referentes às análises de NJ estão acima dos ramos em preto, e às de Máxima Parsimônia (MP) estão expressos abaixo em laranja.

A análise molecular baseada em um total de 15 sequências revela que as sequências obtidas no presente estudo agrupam-se em quatro clados distintos. Exemplares da Ilha da Galé (uma sequência), Ilha do Xavier (quatro sequências) e Ilha das Aranhas (duas sequências), posicionados morfológicamente em *Mesophyllum* sp.1 (analisados no presente estudo), agruparam-se em um clado fortemente sustentado (98% para NJ e 99% para MP). A sequência do espécime da Ilha do Xavier, ainda não identificados morfológicamente (sp.2), posicionou-se em um clado irmão à *Mesophyllum* sp.1.

A sequência de *Mesophyllum erubescens* para a Ilha do Arvoredo agrupou-se com as sequências disponíveis para o Havaí em um clado fortemente sustentado (99% para NJ e 90% para MP) – estes dados serão discutidos no Capítulo II.

Tanto na árvore de UPA como na de SSU rDNA, o indivíduo identificado como *Lithothamnion crispatum* não se agrupou com nenhuma outra sequência, visto que não há outras sequências disponíveis para o referido gênero.

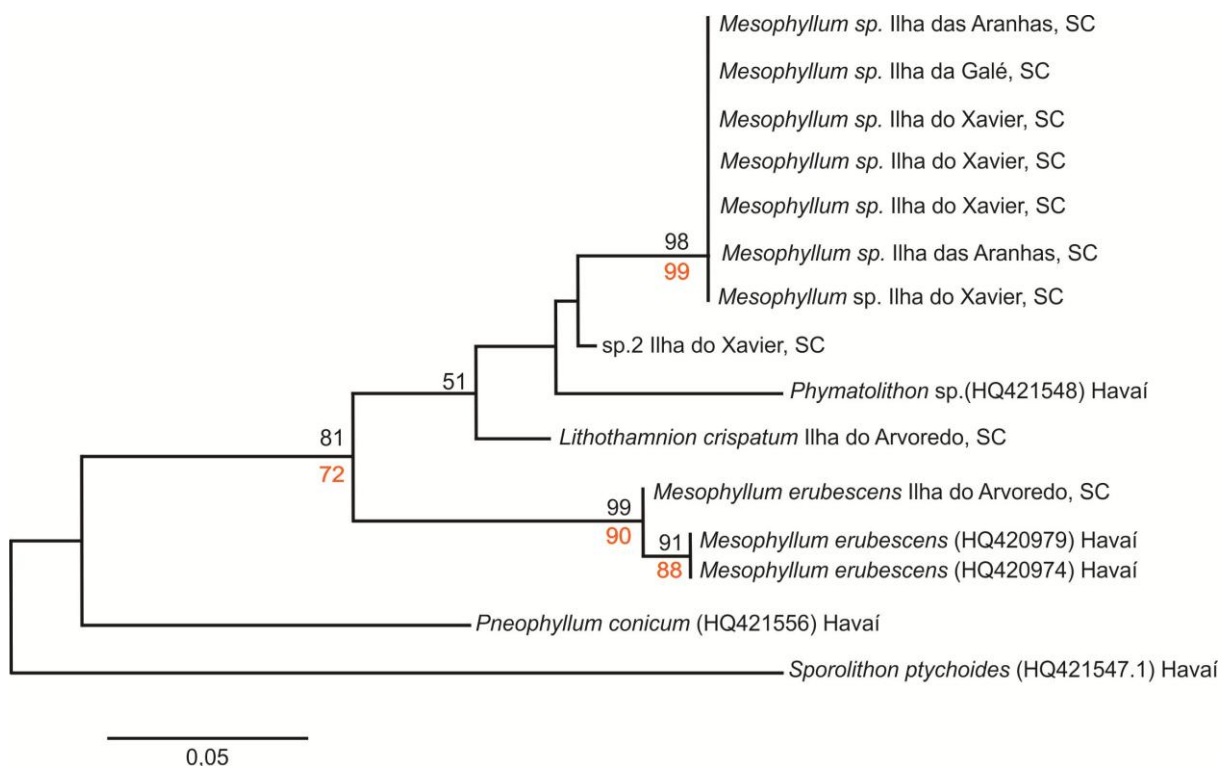


Figura 10. Filograma de distância (*Neighbour joining*) para as sequências de UPA. Dez sequências foram geradas no presente trabalho, ao passo que as outras cinco foram obtidas no Genbank (número de acesso está entre parênteses). Os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) referentes às análises de *Neighbour-joining* (NJ) estão acima dos ramos e em **preto**, e às de Máxima Parsimônia (MP) estão expressos abaixo e em **laranja**. Apenas valores maiores de 50% são indicados. A escala representa o número de substituições.

4.2.2. Análise do SSU

A matriz do SSU rDNA contou com 19 sequências, sendo três delas obtidas no presente estudo (figura 11). A razão de variação entre os sítios foi modelada a partir da distribuição gama (parâmetro = 0,04). Ao todo, foram analisados 1388 pares de base, sendo 215 variáveis. A sequência de *Sporolithon ptychoides* (DQ629013) foi utilizada como grupo externo. Além disso, sempre que aplicável, estão ilustrados os aspectos morfológicos que caracterizam o agrupamento. Por exemplo, *Mesophyllum erubescens* caracteriza-se por apresentar conceptáculos multiporados, células epiteliais de arredondadas à achatadas, células subepiteliais mais alongadas do que as subseqüentes e células que delimitam o canal do poro com tamanho diferente às dos filamentos adjacentes, sendo a basal marcadamente mais alongada.

O filograma mostra que as sequências de *Mesophyllum* agruparam-se em um grande clado, juntamente com as sequências de exemplares dos gêneros *Synarthrophyton* (EF628217) e *Phymatolithon* (U60741 e U60740).

A sequência de *Mesophyllum erubescens* (U61257) para o Brasil agrupou-se fortemente (96% para NJ e 99% para MP) com as sequências da mesma espécie descrita para o Havaí (DQ629012 e DQ629011). Vale ressaltar que as sequências desta espécie para a Nova Zelândia agruparam-se em um clado distinto, fortemente sustentado para MP (98%) e moderado para NJ (78%).

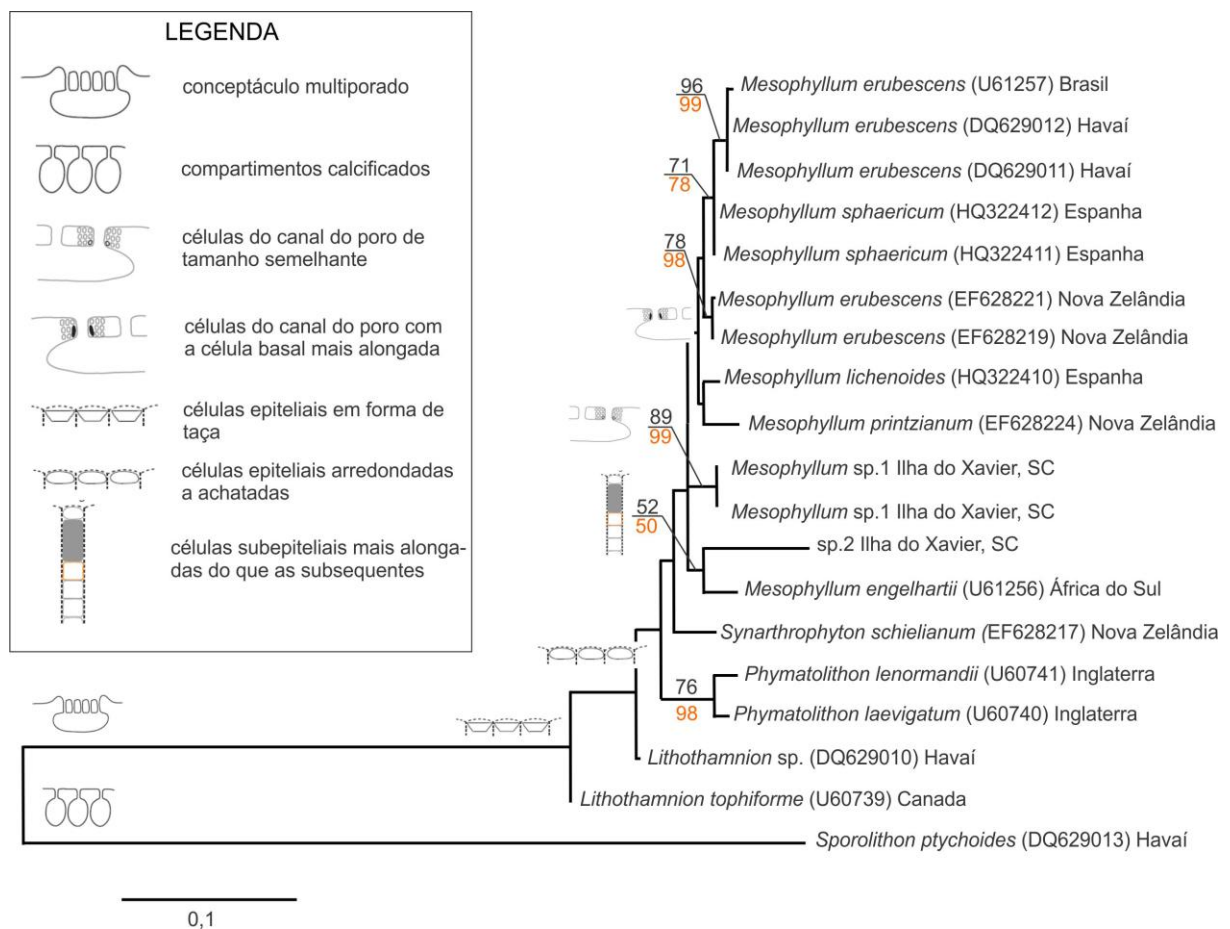


Figura 11. Filograma de distância (*Neighbour-joining* NJ) para as sequências de SSU. Três sequências foram geradas no presente trabalho, ao passo que as outras 16 foram obtidas no Genbank (número de acesso está entre parênteses). Os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) referentes às análises de NJ estão expressas acima dos ramos, em **preto** e às de Máxima Parsimônia (MP) estão expressos abaixo, em **laranja**. Apenas valores maiores de 50% são

indicados. A escala representa o número de substituições. Legenda adaptada de Farr *et al.* 2009.

As sequências obtidas no presente estudo, todas para a Ilha do Xavier, posicionaram-se no “grande clado” *Mesophyllum*. As duas sequências morfológicamente caracterizadas como *Mesophyllum* sp1. agruparam-se com um alto suporte (89% para NJ e 99% para MP). Enquanto a sequência referente ao exemplar ainda não identificado agrupa-se em um clado irmão com *Mesophyllum engelhartii* (U61256) da África do Sul.

5. Discussão

Todos os exemplares estudados apresentam tetrasporângios que se desenvolvem dentro de conceptáculos multiporados, bem como células dos filamentos adjacentes ligados por fusões celulares, conferindo com os conceitos de Hapalidiaceae e da subfamília Melobesioideae (Harvey *et al.* 2003b). Os dois descritores moleculares utilizados reafirmam a natureza monofilética do grupo quando comparado a representantes da família Corallinaceae e Sporolithaceae.

A presença de células epiteliais esféricas ou ligeiramente achatadas, mas nunca em forma de taça, e de células subepiteliais mais alongadas do que as subseqüentes e ausência de *pit connections* secundárias subsidiam a delimitação do gênero *Mesophyllum* (Woelkerling 1988, Wilks & Woelkerling 1995; Athanasiadis *et al.* 2004). Apesar de não termos observado conceptáculos gametangiais masculinos, que guardam as características diagnósticas para segregar *Mesophyllum* de *Phymatolithon*, as sequências de UPA e SSU apóiam o posicionamento de parte de nossos espécimes no referido gênero, como destacado nas figuras 10 e 11.

Dentre os gêneros de Hapalidiaceae, o formato das células epiteliais em forma de taça é característico de *Lithothamnion*, que assim como *Mesophyllum*, apresenta talo monômero e filamentos adjacentes ligados por fusões celulares (Woelkerling 1988; Woelkerling 1996; Harvey *et al.* 2003a e 2003b). Como ainda não existem outras sequências de UPA, além da obtida no presente estudo, para fins de comparação, as análises moleculares ainda são limitadas para a delimitação do grupo.

Embora o outro material analisado no presente estudo tenha se agrupado com outras sequências de *Mesophyllum* tanto das análises de UPA, como na de SSU, os espécimes alocados em sp.2 carecem de mais estudos morfológicos e moleculares para uma melhor elucidação.

Eficiência dos marcadores moleculares

O *cox1*, região que transcreve para a subunidade I da citocromo oxidase, é um gene mitocondrial largamente empregado como *DNA barcode* para as algas vermelhas (Geraldino *et al.* 2006; Robba *et al.* 2006; Yang *et al.* 2007). Contudo, a amplificação e sequenciamento deste marcador tem-se mostrado difícil entre as algas calcárias (Sherwood *et al.* 2010), sendo necessário combinar pares de *primers* para se obter os cerca de 710 pares de base correspondentes a este gene.

Para o levantamento da biodiversidade de algas vermelhas do Havaí, Sherwood *et al.* (2010) utilizaram três regiões: o LSU rDNA nuclear (gene que transcreve para a região grande do ribossomo), o UPA do genoma do cloroplasto e o *cox1* do genoma mitocondrial. Dentre as mais de duas mil sequências obtidas, para os variados grupos de algas vermelhas, o UPA surpreendeu por sua universalidade. Quanto à facilidade na obtenção dos dados, e apresentou uma variação intermediária entre o *cox1* e o LSU.

No presente estudo, o UPA pôde ser facilmente amplificado e sequenciado para todas as amostras. Quanto à resolução para níveis taxonômicos mais baixos, mostrou-se eficiente na separação dos dois gêneros encontrados – *Mesophyllum* e *Lithothamnion*, além de corroborar o posicionamento de duas espécies morfológicamente distintas: *Mesophyllum erubescens* e *Mesophyllum* sp. A variação intraespecífica desse marcador foi de 0,0 a 0,6% para *M. erubescens* e 0,0 a 0,3% para *Mesophyllum* sp.1, valores inferiores àqueles observados dentro do gênero *Mesophyllum* (7,1-7,6%).

Embora seja mais conservado, o SSU também se mostrou adequado na separação dos exemplares de *Mesophyllum* sp. para a Ilha do Xavier, das demais espécies do gênero.

As análises multigênicas tornaram-se a regra nas reconstruções filogenéticas (Yoon *et al.* 2006, Broom *et al.* 2008). As análises provenientes das sequências de UPA foram ao encontro daquelas obtidas para o SSU. A associação dos dados provenientes destes dois

marcadores moleculares forneceu mais robustez e confiabilidade aos resultados, que foram ao encontro das análises morfológicas.

6. Considerações Finais

Na área de estudo, os exemplares amostrados foram morfolologicamente posicionados em: *Mesophyllum erubescens*, *Mesophyllum* sp., *Lithothamnion crispatum* e sp.2. As análises provenientes das sequências de UPA e SSU corroboraram a caracterização morfológica dos espécimes. Tais marcadores podem ser utilizados, aliados às técnicas atuais de identificação, como ferramenta taxonômica. Entretanto, devido à carência de sequências, tanto de UPA como de SSU rDNA, para as algas calcárias não articuladas, são necessárias mais pesquisas que avaliem a variação (intra e interespecífica) de ambos marcadores a fim de validar sua eficiência para o grupo.

Referências

- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhanh, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lipman, D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Athanasiadis, A.; Lebednik, P.A. & Adey, W.H. 2004. The genus *Mesophyllum* (Melobesioideae, Corallinales, Rhodophyta) on the northern Pacific coast of North America. *Phycologia* 43:126-165.
- Bailey, J. C. & Chapman, R. L. 1996. Evolutionary relationships among coralline red algae (Corallinaceae, Rhodophyta) inferred from 1 8S rRNA gene sequence analysis. In: Chaudhary, B. R.; Agrawal, S. B. [Eds.] *Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae*. Academic Publishing, Amsterdam pp.363–76.
- Bailey, J.C. & Freshwater, D.W. 1997. Molecular systematic of the Gelidiales: inferences from separate and combined analyses of plastid *rbcL* and nuclear SSU gene sequences. *European Journal of Phycology* 32: 343-352.
- Basso, D.; Rodondi, G. & Bressan, G. 2010. A re-description of *Lithothamnion crispatum* and the status of *Lithothamnion superpositum* (Rhodophyta, Corallinales). *Phycologia* 50: 144-155.
- Broom, J.E.S.; Hart, D.R.; Farr, T.J.; Nelson, W.A.; Neil, K.F.; Harvey, A.S. & Woelkerling, W.J. 2008. Utility of *psbA* and nSSU for phylogenetic reconstruction in the Corallinales based on New Zealand taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 958- 973.
- Burgos, C.B. Composição e estrutura das comunidades de macroalgas do infralitoral do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco – Brasil, com ênfase nas calcárias incrustantes. Tese de Doutorado, Universidade Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.
- Cabioch, J. & Mendoza, M.L. 1998. *Mesophyllum alternans* (Foslie) comb. nov. (Corallinales, Rhodophyta), a mediterraneo-atlantic species, and new considerations on the *Lithothamnion philippii* Foslie complex. *Phycologia* 37: 208-221

- Chamberlain, Y.M. 1983. Studies in the Corallinaceae with special reference to *Fosliella* and *Pneophyllum* in the British Isles. *Bulletin of British Museum (Natural History) Botany Series* 11: 291-463.
- Dawson, E.Y. 1960. New records of marine algae from Pacific Mexico and Central America. *Pacific Naturalist* 1:31-52.
- Dickie, G. 1874. Enumeration of algae collected at Fernando de Noronha. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 14: 363-365.
- Dickie, G. 1875. Enumeration of algae collected from Bahia, collected by H.N. Mosely, M.A. naturalist, to H.M.S. "Challenger". *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 14: 377
- Farias, J.N. 2008. Aspectos taxonômicos de *Lithothamnion superpositum* e *Mesophyllum engelhartii* (Corallinales; Rhodophyta) do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil.
- Farr, T.; Broom, J.; Hart, D.; Neill, K. & Nelson, W. 2009. Common coralline algae of northern of New Zeland. *An identification guide. NIWA Information Ser. No. 70.* Wellington, New Zealand p. 125.
- Figueiredo, M.A.O. & Steneck, R.S. 2002. Floristic and ecological studies of crustose coralline algae on Brazil's Abrolhos reefs. In Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium, Bali, p.493-498.
- Foslie, M. 1900. Revised systematical survey of the Melobesieae. Kongelige Norske Vindenskabers Selskabs Skrifter 5:1-22.
- Foslie, M. 1901. New Melobesieae. K. Norske Vindensk. Kongelige Norske Vindenskabers Selskabs Skrifter 6:2-24.
- Geraldino, P. J. L.; Yang, E. C. & Boo, S. M. 2006. Morphology and Molecular Phylogeny of *Hypnea flexicaulis* (Gigartinales, Rhodophyta) from Korea. *Algae* 21: 417-423.
- Gherardi, D.F.M. 2004. Community structure and carbonate production of a temperate rhodolith bank from Arvoredo Island, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* 52: 207-224.

- Gray, J.E. 1864. *Handbook of British Water-Weeds or Algae*. R. Hardwicke, London, pp. 123.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2011. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; acesso em 21 de julho de 2011.
- Harvey, A.S.; Broadwater, S.T.; Woelkerling W.J. & Mitrovski, P.J. 2003a. *Choreonema* (Corallinales, Rhodophyta): 18S rDNA phylogeny and resurrection of the Hapaladiaceae for the subfamilies Choreonematoideae, Austrolithoideae and Melobesioideae. *Journal of Phycology* 39: 988–998.
- Harvey, A.S.; Woelkerling, W.J. & Millar, A.J.K. 2003b. An account of the Hapalidiaceae (Corallinales, Rhodophyta) in south-eastern Australia. *Australian Systematic Botany* 16: 647-698.
- Horta, P.A. 2000. Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil: Taxonomia e Biogeografia. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Horta, P.A. 2002. Bases para a identificação das coralináceas não articuladas do litoral brasileiro – uma síntese do conhecimento. *Biotemas* 15: 7-44.
- Horta, P. A. ; Scherner, F.; Bouzoun, Z. L.; Riosmena-Rodriguez, R.& Oliveira, E. C. 2011. Morphology and reproduction of *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lenoime (Corallinales, Rhodophyta) of Southern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 34: 125-134.
- Kützinger, F.T. 1843. *Phycologia Generalis* F. A. Brockhaus, Leipzig, pp. 458.
- Lemoine, Me.P. 1928. Un nouveau genre de Mélobésiées: *Mesophyllum*. *Bulletin Société Botanique de France* 75:251-254.
- Nunes, J.M.C.; Guimarães, S.M.P.B.; Donangelo, A., Farias, J. & Horta, P.A. 2008. Aspectos taxonômicos de três espécies de coralináceas não geniculadas do litoral do estado da Bahia, Brasil. *Rodriguésia* 59:75-86.
- Presting, G. G. 2006. Identification of conserved regions in the plastid genome – implications for DNA barcoding and biological function. *Canadian Journal of Botany* 84: 1434-43.

- Robba, L.; Russell, S.J.; Barker, G. L.; Brodie, J. 2006. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *American Journal of Botany* 93: 1101-1108.
- Sherwood, A.R.; Kurihara, A.; Conklin, K.; Sauvage, T. & Presting, G.G. 2010. The Hawaiian Rhodophyta Biodiversity Survey (2006-2010): a summary of principal findings. *Plant Biology* 10: 258.
- Taylor, W.R. 1960. Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas. *University of Michigan Press*, Michigan.
- Wilks K.M. & Woelkerling, W.J. 1995. An account of Southern Australian species of *Lithothamnion* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany* 8: 549-583.
- Woelkerling, W.J. 1988. The Coralline red algae: An analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate corallinaceae. *British Museum (Natural History) and Oxford University Press*: London e Oxford.
- Woelkerling, W.J. 1996. The order Corallinales. In: Womersley, H.B.S. (ed). *The marine Benthic Flora of Southern Australia, Part IIIB*. Graphic Print Group, Adelaide, p. 146-323.
- Woelkerling, W.J.; Spencer, K.G. & West, J.A. 1993. Studies on selected Corallinaceae (Rhodophyta) and other algae in a defined marine culture medium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 67: 61-77.
- Wynne, M.J. 2005. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision, *Nova Hedwigia* 129: 1-152.
- Yang, E. C.; Kim, M. S.; Geraldino, P. J. L.; Sahoo, D.; Shin, J. A. & Boo, S. M. 2007. Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 20:161-168.

Capítulo II

Capítulo II - *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lemoine (Corallinales, Rhodophyta) em ilhas costeiras do sul e sudeste do Brasil - uma reavaliação utilizando aspectos morfológicos e moleculares

Resumo

Mesophyllum é descrito por Lemoine (1928) baseado na presença de um hipotalo coaxial. Essa característica foi aceita por 60 anos, quando Woelkerling (1988) examinou sua validade em relação aos gêneros *Clathromorphum* Foslie e *Synarthrophyton* Townsend, visto que algumas espécies combinam áreas coaxiais e não coaxiais em alguns talos. Woelkerling e Harvey (1993) propõem, então, a utilização da anatomia dos conceptáculos espermatangiais na delimitação de *Mesophyllum*, incluindo, ainda, caracteres como: (1) construção monômera; (2) ausência de haustório; (3) células epiteliais esféricas ou achatadas, mas nunca em forma de taça; (4) ativa divisão das células sub-epiteliais, usualmente alongadas; (5) câmaras dos conceptáculos carposporangiais em forma de halteres. *Mesophyllum erubescens* é descrito originalmente para o Arquipélago Fernando de Noronha (Foslie 1900) e, atualmente, possui distribuição cosmopolita, para todos os oceanos. O presente trabalho apresenta a descrição de aspectos morfológicos e pela primeira vez para o Atlântico sul, a análise do UPA na delimitação de *Mesophyllum erubescens*, utilizando material coletado em ilhas costeiras do litoral sudeste e sul do Brasil. Considerando características morfo-anatômicas e moleculares o material analisado para o litoral sul e sudeste do Brasil, juntamente com *M. erubescens* do Havaí, se posiciona em um clado fortemente sustentado, evidenciando representarem uma mesma entidade específica. O presente trabalho discute ainda a validade das características morfoanatômicas tradicionalmente utilizadas na delimitação do referido táxon, utilizando como subsídios as informações moleculares relacionadas ao UPA.

Palavras-chave: Hapalidiaceae, *Mesophyllum erubescens*, UPA

1. Introdução

Hapalidiaceae compreende as algas calcárias não articuladas cujos tetrasporângios e bisporângios são zonados e se desenvolvem na maior parte das vezes em conceptáculos multiporados. Além disso, produzem tampões apicais que bloqueiam a saída dos esporângios pelos poros até que estejam maduros (Harvey *et al.* 2003). As características do teto do conceptáculo aliadas à presença ou ausência de fusões celulares e são informações utilizadas na diferenciação das três subfamílias reconhecidas em Hapalidiaceae: Austrolithoideae, Choreonematoideae e Melobesioideae (tabela 1, adaptado de Harvey *et al.* 2003a; Harvey *et al.* 2003b).

Tabela 1 - Características diagnósticas para as três subfamílias de Hapalidiaceae (adaptado de Harvey *et al.* 2003a; Harvey *et al.* 2003b)

Hapalidiaceae	Características diagnósticas para as subfamílias	Gêneros com espécies vivas
Austrolithoideae	Células dos filamentos vegetativos adjacentes livres entre si, não apresentando ligações por fusões celulares ou conexões citoplasmáticas secundárias. Conceptáculos tetrasporangiais multiporados.	<i>Austrolithon</i> , <i>Boreolithon</i>
Choreonematoideae	Células dos filamentos vegetativos adjacentes livres entre si, não apresentando ligações por fusões celulares ou conexões citoplasmáticas secundárias. Conceptáculos tetrasporangiais uniporados.	<i>Choreonema</i>
Melobesioideae	Células dos filamentos vegetativos adjacentes ligados por fusões celulares, conexões citoplasmáticas secundárias ainda desconhecidas. Conceptáculos tetrasporangiais multiporados.	<i>Clathromorphum</i> , <i>Exilicrusta</i> , <i>Kvaleya</i> , <i>Lithothamnion</i> *, <i>Mastophoropsis</i> , <i>Melobesia</i> *, <i>Mesophyllum</i> *, <i>Phymatolithon</i> *, <i>Synaethrophyton</i>

*Gêneros referenciados para o Brasil.

Melobesioideae inclui nove gêneros com espécies vivas, dos quais, quatro são referidos para o Brasil: *Lithothamnion* Heydrich, *Melobesia* Lamouroux, *Mesophyllum* Me. Lemoine e *Phymatolithon* Foslie (Horta 2002, Tâmega & Figueiredo 2005, Horta *et al.* 2011).

Mesophyllum foi descrito por Lemoine (1928) baseado na disposição concêntrica (coaxial) da medula (hipotalo), ou seja, na presença de um hipotalo coaxial. Essa

característica foi aceita por 60 anos, quando Woelkerling (1988) examinou sua validade em relação aos gêneros *Clathromorphum* Foslíe e *Synarthrophyton* Townsend, visto que algumas espécies combinam áreas coaxiais e não coaxiais em alguns talos. Woelkerling e Harvey (1993) propõem, então, a utilização da anatomia dos conceptáculos espermatangiais na delimitação de *Mesophyllum*, como sugerido por Lebednik (1978), Townsend (1979), Woelkerling & Harvey (1993), Keats & Maneveldt (1997) e Athanasiadis *et al.* (2004). Incluíram ainda caracteres como:

1. construção monômera;
2. ausência de haustório;
3. células epiteliais esféricas ou achatadas, mas nunca em forma de taça;
4. ativa divisão das células sub-epiteliais, usualmente alongadas;
5. células mãe dos espermatângios não ramificadas ocorrendo tanto no teto quanto no assoalho do conceptáculo;
6. câmaras dos conceptáculos carposporangiais em forma de halteres.

Das sete espécies de *Mesophyllum* registradas para a costa oeste do oceano Atlântico (Wynne 2005), apenas três foram descritas de forma detalhada segundo sua morfologia e anatomia (Athanasiadis 1999, Nunes *et al.* 2008, Farias 2009): *M. ornatum* (Foslíe & Howe) Athanasiadis, *M. mesomorphum* (Foslíe) Adey e *M. erubescens* (Foslíe) Me. Lemoine.

Mesophyllum erubescens (Foslíe) Me. Lemoine foi descrita originalmente para o Arquipélago Fernando de Noronha (Foslíe 1900), tendo sido esta identificação re-avaliada por Burgos (2011). Presente em todos os oceanos tropicais (Foslíe 1900; Ringeltaube & Harvey 2000; Oliveira *et al.* 2005; Silva *et al.* 1996; Keats & Chamberlain 1994), a referida espécie foi ainda registrada para o litoral nordeste (Nunes *et al.* 2008) e sul do Brasil (Horta *et al.* 2011). O presente trabalho apresenta a descrição de aspectos morfológicos e, pela primeira vez para o Atlântico Sul, a análise do UPA na delimitação de *Mesophyllum erubescens*, utilizando material coletado em ilhas costeiras do litoral sudeste e sul do Brasil.

2. Objetivos

Descrever *Mesophyllum erubescens* (Foslíe) Me. Lemoine (Corallinales, Rhodophyta) sob uma perspectiva morfoanatômica e molecular para ilhas costeiras do litoral sudeste e sul do Brasil.

2.1. Objetivos específicos

- Descrever a morfo-anatomia de *Mesophyllum erubescens* da Ilha Queimada Grande, SP.
- Extrair o DNA, amplificar e sequenciar o marcador molecular UPA.
- Avaliar a utilização do UPA como *DNA barcode* para Hapalidiaceae.

3. Material e Métodos

3.1. Área de estudo

Os espécimes foram coletados, através de mergulho autônomo, na Ilha do Arvoredo (27°16'43.91"S 48°22'29.64"O), ao norte da Ilha de Santa Catarina e na Ilha Queimada Grande (24°28'49.25"S 46°40'36.17"O), localizada no litoral sul de São Paulo (figura 1).

A Ilha do Arvoredo faz parte da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo. As coletas foram realizadas no banco de rodolitos situado na enseada do Rancho Norte, que segundo o plano de manejo, esta área é classificada como intangível, pois comporta uma grande heterogeneidade de habitats, logo, uma grande diversidade biológica. Este banco representa o limite sul de distribuição dos bancos de rodolitos na costa brasileira e é formado por formas livres de algas calcárias sobre um substrato arenoso entre 7 e 20 metros de profundidade (Gherardi 2004) (figuras 2 a 5).

A Ilha Queimada Grande é uma Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE). No entanto, há propostas de recategorização e ampliação desta ARIE para Parque Nacional (Moura *et al.* 2003). A Ilha Queimada Grande está localizada ao largo do Município de Itanhaém, São Paulo, a uma distância de 35 km da costa. As coletas foram realizadas na área adjacente ao naufrágio do navio mercante Rio Negro, em uma área caracterizada por fundos rochosos e não consolidados (areia e cascalho), com uma profundidade de até 18 metros (figuras 6 a 8).

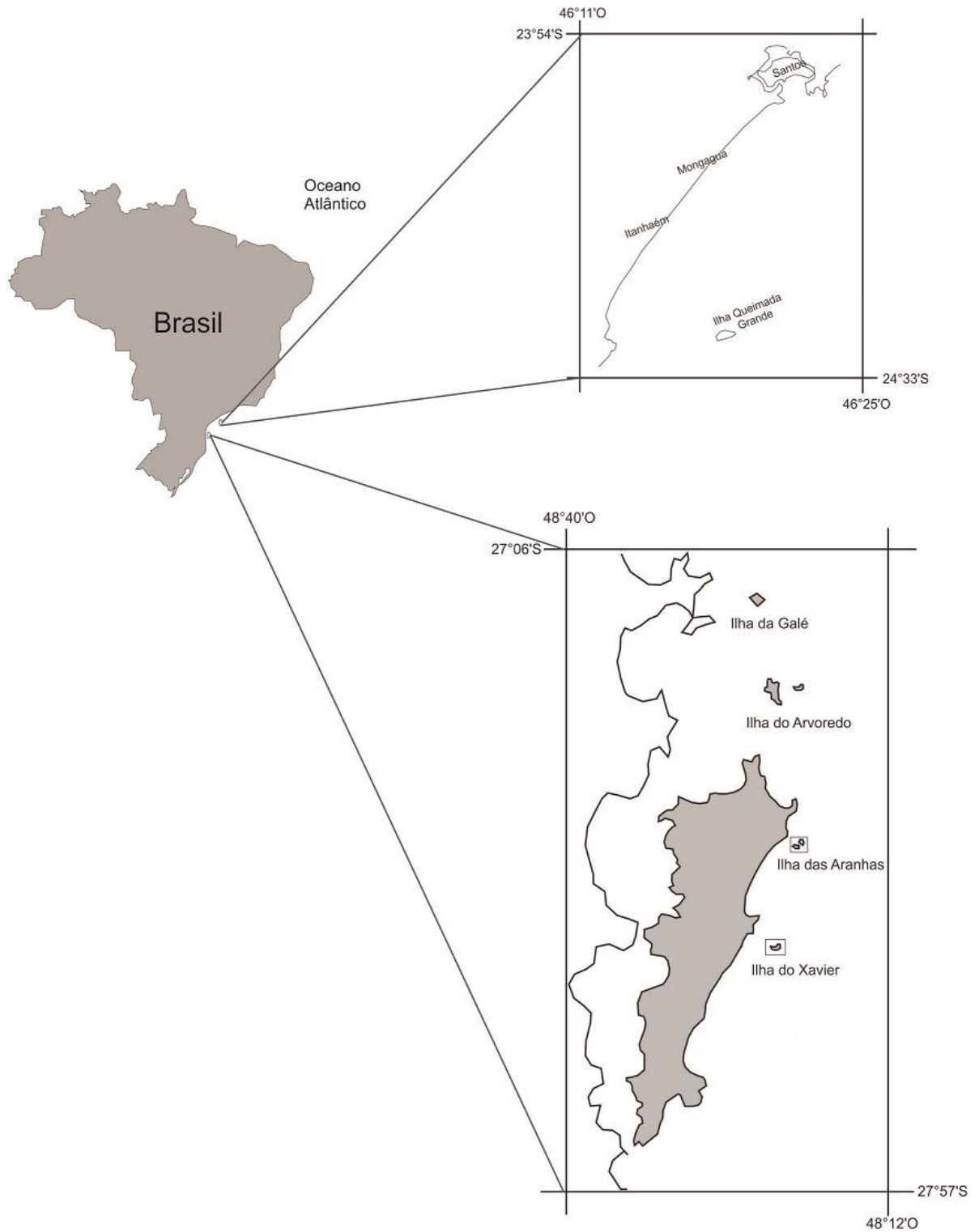
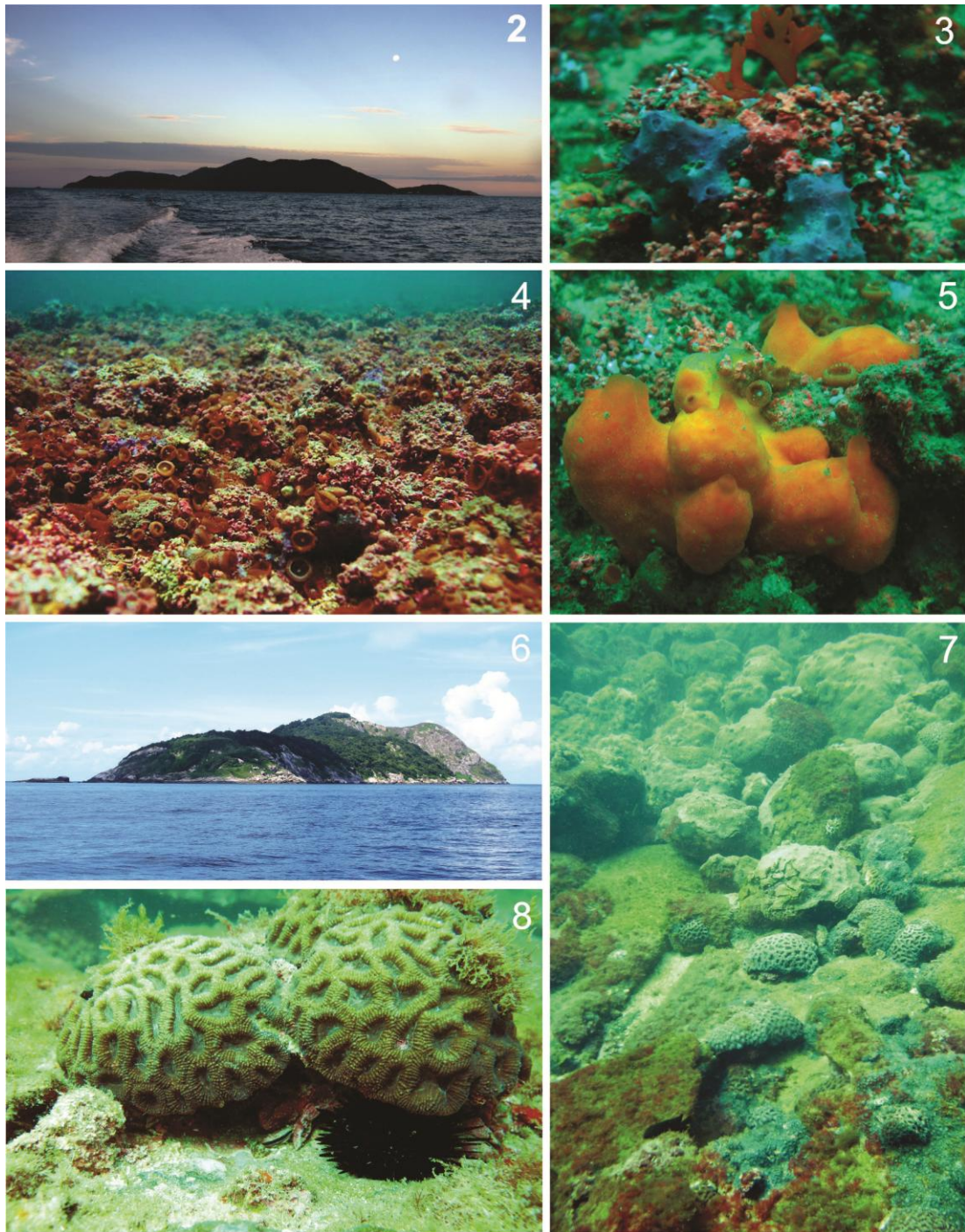


Figura 1 Mapa da área de estudo. Ilha do Arvoredo Arvoredo ($27^{\circ}16'43.91''S$ $48^{\circ}22'29.64''O$), ao norte da Ilha de Santa Catarina e Ilha Queimada Grande ($24^{\circ}28'49.25''S$ $46^{\circ}40'36.17''O$), localizada no litoral sul de São Paulo.



Figuras 2-5 Área de estudo: Ilha do Arvoredo, SC. (2) Vista geral. (3) Biodiversidade associada ao nódulo de alga calcária: porífera e macroalga. (4) Vista do banco de rodolitos. (5) Fauna associado aos nódulos calcários. **Figuras 6-8 Ilha Queimada Grande, SP.** (6) Vista geral. (7) Fundos rochosos e não consolidados, presença de corais cérebro (*Mussismilia* sp.). (8) Detalhe de *Mussismilia* sp. (Fotos: 2,6,7 e 8 por Marina Sissini; fotos: 3, 4 e 5 por Cecília Pascelli)

3.2. Processamento das amostras

As amostras foram processadas em laboratório segundo os procedimentos descritos no item 3.2 do Capítulo I.

3.3. Estudo morfo-anatômico

As lâminas permanentes e os suportes de alumínio (*stubs*) utilizados para a observação em microscopia de luz e microscopia eletrônica, respectivamente, foram preparados de acordo com os procedimentos propostos por Horta (2002), os quais estão apresentados no item 3.3 do Capítulo I.

3.4. Estudo molecular

O processamento das amostras para o estudo molecular foi realizado no Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula” da Universidade de São Paulo. Os procedimentos de extração, amplificação, purificação e sequenciamento do DNA estão descritos no Capítulo I. No entanto, para as análises de agrupamento do UPA utilizou o filograma de distância *neighbour joining* e evolução mínima ao invés de *neighbour joining* e máxima parsimônia.

4. Resultados

4.1. Estudo morfológico

Mesophyllum erubescens (Foslie) Me. Lemoine 1928:252

BASINOMIO: *Lithothamnion erubescens* Foslie 1900:9-10, Taylor (1960)

HOLÓTIPO: TRH, sem número

LOCALIDADE TIPO: Arquipélago Fernando de Noronha, Brasil

FIGURAS



SINÔNIMOS HOMOTÍPICOS

Lithothamnion erubescens Foslie 1900

SINÔNIMOS HETEROTÍPICOS

Lithothamnion erubescens f. *madagascarensis* Foslie 1901

Lithothamnion erubescens f. *haingsisianum* Weber-van Bosse & Foslie 1901

Lithothamnion erubescens f. *subflabellatum* Foslie 1904

Lithothamnion madagascarensis (Foslie) Foslie 1906

Lithothamnion patena f. *incisa* Foslie 1906

Lithothamnion incisum (Foslie) Foslie 1907

Mesophyllum incisum (Foslie) Adey 1970

Mesophyllum madagascarensis (Foslie) Adey 1970

Polyporilthon patena var. *incisa* (Foslie) Chapman & Parkinsn (1974)

ETIMOLOGIA: *Mesophyllum* vem do grego *mesos*, que significa meio e do grego latinizado *phyllon* (folha); provavelmente se referindo à hipótese de Lemoine (1928) de que as espécies de *Mesophyllum* apresentariam uma morfologia intermediária às de *Lithophyllum* e *Lithothamnion* (Woekerling 1988).

DISTRIBUIÇÃO NO LITORAL BRASILEIRO: Santa Catarina (Horta *et al.* 2011), Bahia (Figueiredo & Steneck 2002; Figueiredo *et al.* 2007; Nunes *et al.* 2008) e Fernando de Noronha (Foslie 1900; Burgos 2011).

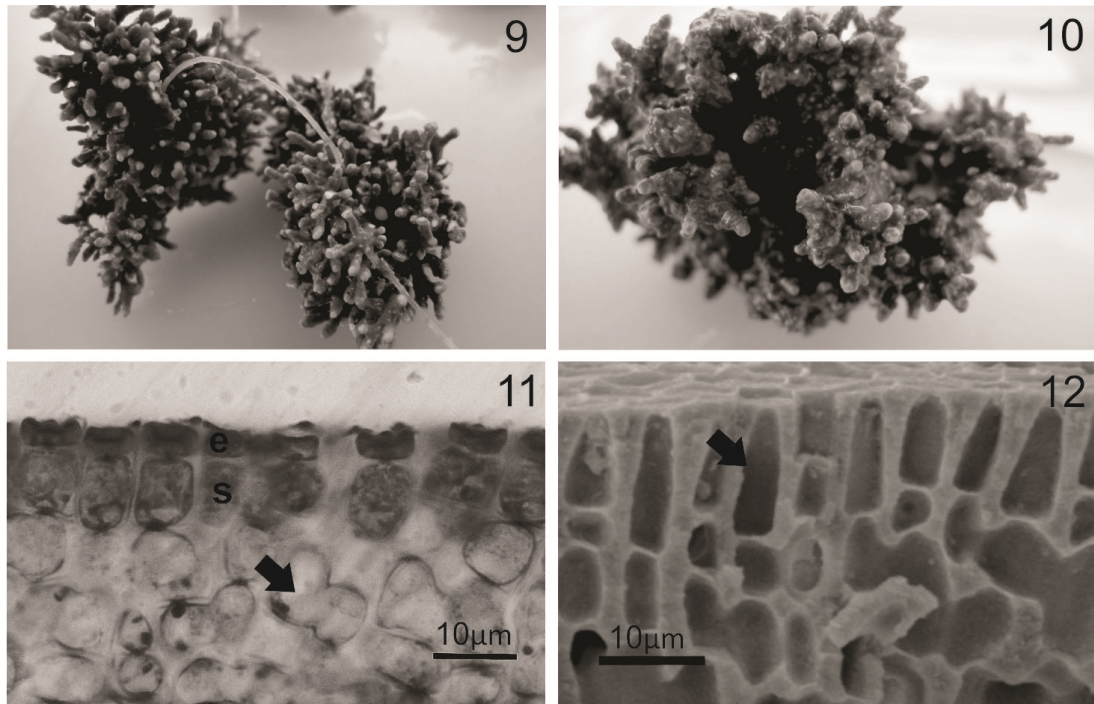
MATERIAL EXAMINADO: **BRASIL. Santa Catarina.** Ilha do Arvoredo, 17.i.2011, M. Sissini & C. Pascelli (FLOR); **São Paulo.** Ilha Queimada Grande, 19.iv.2011, M. Sissini & B. Torrano (FLOR).

DESCRIÇÃO E ILUSTRAÇÕES PARA O MATERIAL DE SANTA CATARINA: em Horta *et al.* 2011

HÁBITO: esta espécie é comum e abundante na área em estudo, frouxamente aderidas ao substrato em associação com outras algas calcárias não articuladas e corais, a uma profundidade entre 8 e 18 metros.

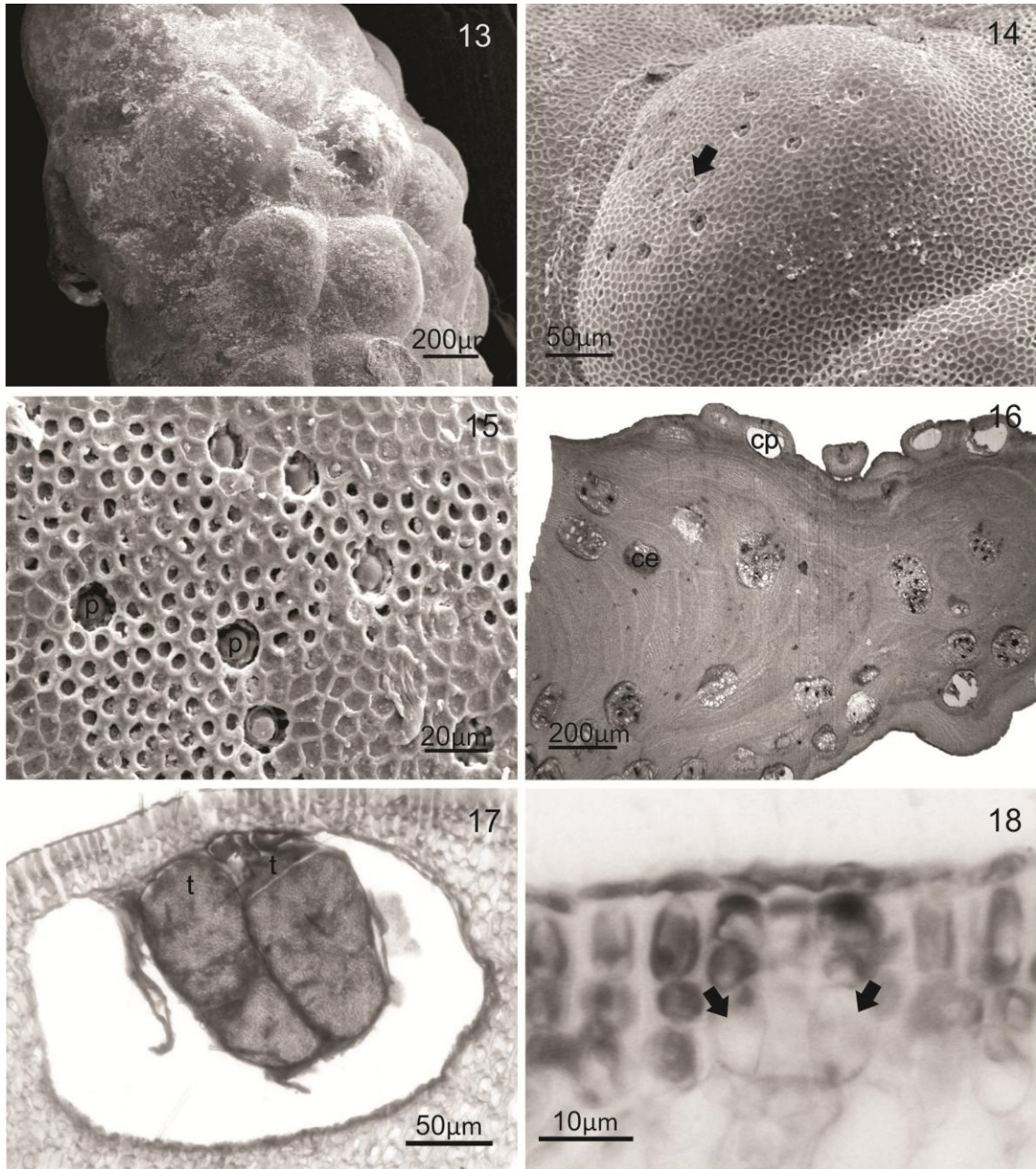
ESTRUTURA VEGETATIVA: Talo violeta amarronzado, com protuberâncias frequentemente ramificadas, basalmente cilíndricas para levemente achatadas (figuras 9 e 10); 1-4 mm em diâmetro e 3-8 mm em comprimento, com fusões freqüentes; talo pseudoparenquimatoso com organização monômera; hipotalo coaxial. Células subepiteliais notavelmente mais altas do que as subseqüentes (figuras 11 e 12), com 8-15µm de altura e 5-8µm de diâmetro. Apresentam uma única camada de células epiteliais cilíndricas ou achatadas, mas nunca em

forma de taça (figura 11), com 2-4 μ m de altura e 5-7 μ m de diâmetro. Células de filamentos adjacentes ligadas por fusões celulares (figura 11); conexões secundárias e haustórios ausentes; tricocitos não foram observados.



Figuras 9-12 Aspecto vegetativo de *Mesophyllum erubescens*. (9) e (10) Exemplos coletados na Ilha Queimada Grande, SP. (11) Corte transversal em MO: Células epiteliais (e) achatadas ou arredondadas, mas não em forma de taça; células subepiteliais (s) mais alongadas do que as subjacentes. Seta indicando fusão celular. (12) Imagem obtida na MEV, seta indica célula subepitelial mais alongada do que as subjacentes.

ESTRUTURA REPRODUTIVA: Conceptáculos tetrasporofíticos multiporados (figuras 13 e 14), elevados em relação à superfície do talo, porém, com o teto afundado; quando maduros, podem ser observados enterrados em meio ao peritalo (figura 16). Câmaras dos conceptáculos em forma elíptica (figuras 16 e 17), com 195-366 μ m de diâmetro e 119-205 μ m de altura; teto composto por filamentos com 5-7 células, com 23-45 μ m de espessura; poro delimitado por filamento de 3-4 células, sendo a célula basal marcadamente mais alongada do que as demais células do teto (figura 18), 4-7 μ m diâmetro e 9-11 μ m altura. Tetrasporângio maduro com 53-82 μ m de diâmetro e 73-142 μ m de altura, formado por quatro tetrásporos zonados. Não foram observadas plantas gametangiais.



Figuras 13-18 Aspecto reprodutivo de *Mesophyllum erubescens*. (13-15) Vista superficial em MEV. (14) Detalhe de um conceptáculo multiporado (seta indicando poro). (15) Detalhe dos poros (p). (16) Corte transversal do talo com conceptáculos multiporados na superfície e enterrados (ce). (17) Corte transversal de um conceptáculo multiporado com tetrasporângios (t). (18) Detalhe das células que delimitam o canal do poro, destacando-se célula basal mais alongada (setas).

4.2. Estudo molecular

A análise molecular baseada em um total de 11 sequências, seis das quais obtidas no presente estudo, revela que os exemplares brasileiros (SC e SP) de *M. erubescens* agruparam-se com as sequências de materiais do Havaí em um clado fortemente sustentado [99% *bootstrap* para *neighbour-joining* (NJ) e 98% evolução mínima (ME)]. Os demais espécimes morfológicamente posicionados em *Mesophyllum*, analisados no presente estudo, segregam-se com um suporte moderado (70% para ME) e baixo (62%) para NJ, se posicionando em um mesmo clado que *Phymatolithon* sp. identificado para o Havaí.

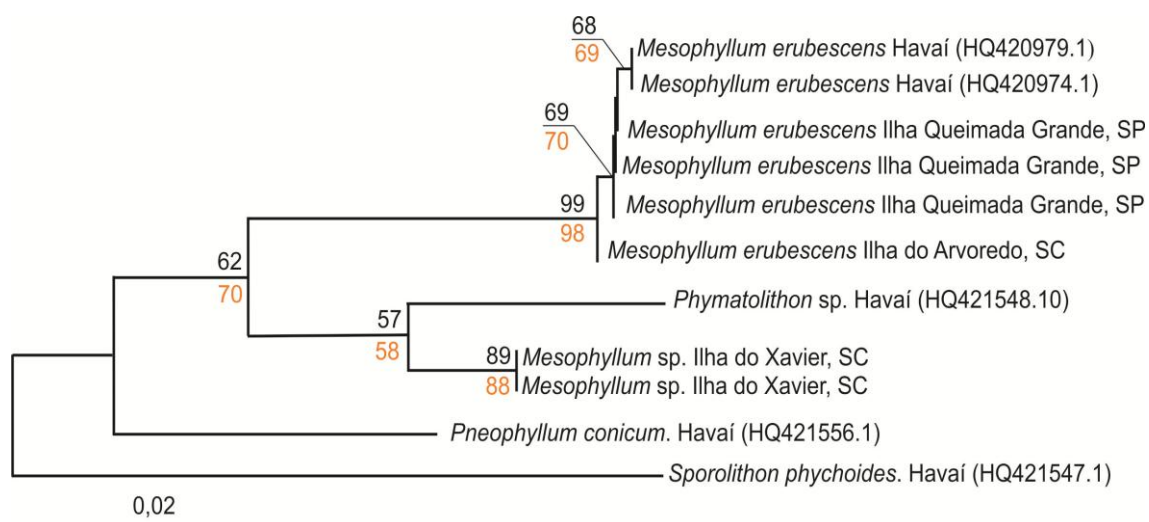


Figura 19. Filograma de distância (NJ) para as sequências de UPA. Seis sequências foram geradas no presente trabalho, ao passo que as outras cinco foram obtidas no Genbank (número de acesso está entre parênteses). Os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) referentes às análises de NJ estão expressas acima dos ramos, em preto e os valores de mínima evolução (ME) estão abaixo, em laranja. Apenas valores maiores de 50% são indicados. A escala representa o número de substituições.

A matriz com as sequências de UPA mostra que dos 370 pb, 67 foram variáveis. Quando comparadas apenas as sequências de *M. erubescens*, apenas dois, dos 370 pb foram variáveis.

A matriz de identidade (tabela 2) para as sequências de UPA reforça os dados obtidos nos filogramas de NJ e ME, ou seja, que as sequências de *M. erubescens* apresentam alta similaridade (valores superiores a 99%).

Tabela 2 - Matriz de identidade entre as sequências de UPA. Os valores **em negrito** comparam as sequências do Havaí com as da IQG; os valores sublinhados comparam as sequências do Havaí com IA e, os valores com *, são referentes às sequências de IQG.

e IA. IQG: Ilha Queimada Grande; IA: Ilha do Arvoredo; IG: Ilha da Galé; IX: Ilha do Xavier

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. <i>Mesophyllum erubescens</i> IQG/SP	ID										
2. <i>Mesophyllum erubescens</i> IQG/SP	1	ID									
3. <i>Mesophyllum erubescens</i> IQG/SP	1	1	ID								
4. <i>Mesophyllum</i> sp.(MS#100) IG/SC	0,927	0,927	0,927	ID							
5. <i>Mesophyllum</i> sp.(MS#30) IX/SC	0,927	0,927	0,927	1	ID						
6. <i>Pneophyllum conicum</i> (HQ421556.1)	0,913	0,913	0,913	0,908	0,908	ID					
7. <i>Phymatolithon</i> sp. (HQ421548.1)	0,91	0,91	0,91	0,948	0,948	0,916	ID				
8. <i>Mesophyllum erubescens</i> (HQ420979.1)	0,997	0,997	0,997	0,924	0,924	0,91	0,908	ID			
9. <i>Mesophyllum erubescens</i> (HQ420974.1)	0,997	0,997	0,997	0,924	0,924	0,91	0,908	1	ID		
10. <i>Mesophyllum erubescens</i> (MS#10) IA/SC	0,997*	0,997*	0,997*	0,929	0,929	0,91	0,913	<u>0,994</u>	<u>0,994</u>	ID	
11. <i>Sporolithon ptychoides</i> (HQ421547.1)	0,883	0,883	0,883	0,9	0,9	0,9	0,902	0,881	0,881	0,886	ID

5. Discussão

Os espécimes determinados, no presente trabalho, como *Mesophyllum erubescens* apresentam as características principais para o gênero *Mesophyllum* (Woelkerling 1988; Wilks & Woelkerling 1995; Athanasiadis *et al.* 2004): (1) talo monômero; (2) haustório ausente; (3) células epiteliais esféricas ou ligeiramente achatadas, mas nunca em forma de taça; (4) células subepiteliais alongadas; (5) ausência de *pit connections* secundárias.

Características importantes para a distinção entre os gêneros *Mesophyllum* e *Synartrophyton* estão na morfologia e ontogenia dos filamentos espermatangiais. Enquanto *Mesophyllum* apresenta conceptáculos masculinos com filamentos espermatangiais não ramificados, *Synartrophyton* apresenta filamentos ramificados e não ramificados em um mesmo conceptáculo masculino. Os gêneros *Mesophyllum*, *Phymatolithon* e ainda, *Synartrophyton* não estão completamente elucidados, pois vários de seus caracteres diagnósticos se sobrepõem. Além disso, existe a dificuldade de observar características tradicionalmente consideradas como diagnósticas, já que talos masculinos são bastante raros na natureza.

Para os espécimes da Ilha do Arvoredo, Horta *et al.* (2011) observaram filamentos espermatangiais não ramificados (p. 128, Horta *et al.* 2011). Considerando os aspectos moleculares, o agrupamento da sequência de UPA da Ilha do Arvoredo com a sequência de *M. erubescens* do Havaí, confirmam o posicionamento do referido exemplar no gênero *Mesophyllum*.

Filamentos espermatangiais não foram observados para o material da Ilha Queimada Grande, o que fragilizaria a delimitação do gênero caso esta estivesse dependente unicamente das características morfoanatômicas. Por outro lado, as sequências de UPA posicionaram-se no clado juntamente com *M. erubescens* do Havaí e da Ilha do Arvoredo. Desta maneira, coloca-se em discussão as características dos filamentos que delimitam o canal do poro como informações diagnósticas para a espécie, uma vez que suas células basais apresentaram-se sistematicamente alongadas em relação às demais do teto do conceptáculo multiporado em todos os espécimes analisados no litoral brasileiro (Nunes *et al.* 2008; Burgos 2011; Horta *et al.* 2011). Adicionalmente, as observações do material descrito para o litoral sudeste da Austrália (Harvey *et al.* 2003b) mostram que a forma e o tamanho das células que delimitam o canal do poro diferem dos exemplares observados para o litoral brasileiro (Nunes *et al.* 2008; Burgos 2011; Horta *et al.* 2011, presente estudo). Desta forma é sugerido que o material australiano, então posicionado como *M. erubescens*, deva corresponder a outra espécie.

Mesophyllum erubescens (Foslie) Me. Lemoine foi primeiramente relatado por Dickie (1874) para o Arquipélago Fernando de Noronha como *Lithothamnion mamillare* Harvey, e esteve presente também em listas de algas brasileiras publicadas por Hemsley (1885) e Murray (1893). No entanto, a descrição do material foi feita por Foslie (1900), como *Lithothamnion erubescens*. Me. Lemoine (1928), com base na presença de um hipotalo coaxial, posiciona este material como parte de um novo gênero, *Mesophyllum*, posteriormente aceito por Adey (1970) e Woelkerling (1988).

Segundo Guiry & Guiry (2011), *Mesophyllum erubescens* possui ampla distribuição (como apresentado na figura 20), sendo descrito para Brasil (Taylor 1930), Índia (Sahoo *et al.* 2001), Japão (Yoshida *et al.* 1990), Vietnã (Pham-Hoàng 1969), Indonésia (Silva *et al.* 1996), Ilhas Canárias (John *et al.* 2004), Cabo Verde (John *et al.* 2004, Prud'homme van Reine *et al.* 2005), Quênia (Silva *et al.* 1996), Madagascar (Silva *et al.* 1996), Maurício (Silva *et al.* 1996), Senegal (John *et al.* 2004), África do Sul (Silva *et al.* 1996), Tanzânia (Silva *et al.*

1996; Oliveira *et al.* 2005), Ilhas Cocos (Silva *et al.* 1996), Índia (Silva *et al.* 1996), Sri Lanka (Silva *et al.* 1996), China (Tseng 1984), Japão (Yoshida 1998), Coreia (Lee & Kang 2001), Rússia (Perestenko 1994), Indonésia (Verheij & Prud'homme van Reine 1993), Malásia (Silva *et al.* 1996), Filipinas (Silva *et al.* 1987), Cingapura (Silva *et al.* 1996), Vietnã (Tsutsui *et al.* 2005), Austrália e Nova Zelândia (Ringeltaube & Harvey 2000; Phillips 2002; Harvey *et al.* 2003), Micronésia (Lobban & Tsuda 2003), Fiji (N'Yeurt *et al.* 1996; South & Skelton 2003, Littler & Littler 2003), Polinésia Francesa (Payri *et al.* 2000; N'Yeurt & Payri 2010).



Figura 20. Distribuição mundial de *Mesophyllum erubescens*, segundo dados publicados (Guiry & Guiry 2011).

Ainda, as descrições de *M. erubescens* para o litoral brasileiro e a presente descrição para ilhas costeiras do litoral sudeste do Brasil compartilham características morfológicas semelhantes. As medidas dos caracteres vegetativos e reprodutivos são comparadas na tabela 3.

Através da análise de componentes principais da matriz de gêneros algais, Horta *et al.* (2001) propõem três regiões biogeográficas para explicar a distribuição e origem das macroalgas marinhas do litoral brasileiro. Neste trabalho, os autores discutem os dois fatores principais que separam o litoral brasileiro em três regiões biogeográficas (manguezal, tropical e temperada quente): (1) heterogeneidade de ambientes e, (2) temperatura.

M. erubescens, em nosso litoral, é encontrada em latitudes que variam de 3°S a 27°S, o que corresponde às regiões biogeográficas tropical e temperada quente (Horta *et al.* 2001), mostrando que, assim como sua distribuição mundial, pode se estabelecer em regiões com grande variação de temperatura.

Tabela 3 – Comparação das descrições mais recentes de *Mesophyllum erubescens* para materiais brasileiros.

	<i>M. erubescens</i> presente estudo	<i>M. erubescens</i> Nunes <i>et al.</i> (2008)	<i>M. erubescens</i> Burgos (2011)	<i>M. erubescens</i> Horta <i>et al.</i> (2011)
I. CARACTERES VEGETATIVOS				
protuberâncias diâmetro (µm)	1 - 4	2 - 5	-	1 - 3
protuberâncias altura (µm)	3 - 8	20	-	2 - 7
tricócitos (+/-)	não observado	-	sim	-
diâmetro (µm)	-	-	3,2 - 7,2	-
altura (µm)	-	-	14 - 16	-
células epiteliais				
diâmetro (µm)	5 - 7	5 - 8	8,1 - 8,5	4 - 9
altura (µm)	2 - 4	~ 5	3,5 - 5,4	2 - 4
células subepiteliais				
diâmetro (µm)	5 - 8	4 - 8	4,6 - 6,9	3 - 6
altura (µm)	8 - 15	7 - 16	8,8 - 9,2	8 - 15
conexões secundárias (+/-)	não	não	não	não
fusões celulares (+/-)	sim	sim	sim	sim
II. CARACTERES REPRODUTIVOS				
conceptáculo				
diâmetro (µm)	195 - 366	195 - 310	214 - 354	254 - 551
altura (µm)	119 - 205	até 150	145 - 150	84 - 153
bis/tetrasporângio diâmetro (µm)	53 - 82	65 - 80	37,5 - 88	33 - 76
bis/tetrasporângio altura (µm)	73 - 142	90 - 110	81 - 100	33 - 118
espessura do teto do conceptáculo				
nº de células	5 -	4 - 5	4 - 6	5 - 7
espessura (µm)	23 - 45	-	25,5 - 42	35 - 45
filamentos canal do poro				
nº de células	3 - 4	-	3	3 - 4
células iguais as demais do teto (+/-)	não	não	não	não
células basais alongadas (+/-)	sim	sim	sim	sim
diâmetro células basais	4 - 7	3 - 5	-	3 - 4
altura células basais	9 - 11	10 - 15	-	12 - 14

6. Considerações finais

A biologia molecular tem sido amplamente utilizada tanto como ferramenta taxonômica, como em reconstruções filogenéticas. O presente estudo registra a ocorrência de *Mesophyllum erubescens* para ilhas costeiras do litoral sudeste e sul do Brasil a partir da associação de análises morfológicas com análises moleculares. As sequências de UPA corroboraram o posicionamento dos exemplares em *M. erubescens* a partir das análises morfo-anatômicas. Para trabalhos futuros, será importante obter sequências de material proveniente da localidade tipo a fim de compará-las às sequências já disponíveis, bem como utilizar outros marcadores moleculares.

Referências

- Adey WH. 1970. A revision of the Foslie crustose coralline herbarium. *Det Kongelige Norske Videnskabers Selskabs Skrifter* 1: 1-46.
- Athanasiadis, A. 1999. *Mesophyllum macedonis* nov.sp. (Rhodophyta, Corallinales), a putative Tethyan relic in the North Aegean Sea. *European Journal of Phycology* 34:239-252.
- Athanasiadis, A.; Lebednik, P.A. & Adey, W.H. 2004. The genus *Mesophyllum* (Melobesioideae, Corallinales, Rhodophyta) on the northern Pacific coast of North America. *Phycologia* 43:126-165.
- Burgos, C.B. Composição e estrutura das comunidades de macroalgas do infralitoral do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco – Brasil, com ênfase nas calcárias incrustantes. Tese de Doutorado, Universidade Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.
- Dickie, G. 1874. Enumeration of algae collected at Fernando de Noronha. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 14: 363-365.
- Farias, J.N. 2008. Aspectos taxonômicos de *Lithothamnion superpositum* e *Mesophyllum engelhartii* (Corallinales; Rhodophyta) do Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil.
- Foslie, M. 1900. Revised systematical survey of the Melobesieae. *Kongelige Norske Videnskabers Selskabs Skrifter* 5:1-22.
- Gherardi, D.F.M. 2004. Community structure and carbonate production of a temperate rhodolith bank from Arvoredo Island, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* 52: 207-224.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2011. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; acesso em 21 de julho de 2011.
- Harvey, A.S.; Broadwater, S.T.; Woelkerling W.J. & Mitrovski, P.J. 2003a. *Choreonema* (Corallinales, Rhodophyta): 18S rDNA phylogeny and resurrection of the

Hapaladiaceae for the subfamilies Choreonematoideae, Austrolithoideae and Melobesioideae. *Journal of Phycology* 39: 988–998.

- Harvey, A.S.; Woelkerling, W.J. & Millar, A.J.K.** 2003b. An account of the Hapalidiaceae (Corallinales, Rhodophyta) in south-eastern Australia. *Australian Systematic Botany* 16: 647-698.
- Hemsley, W.B.** 1885. Report on botany of Bermuda and various other islands of the Atlantic and Southern oceans. In Report on the science results of the voyage of H.M.S. Challenger. Botany. (C.W. Thonson & J.Murray, eds.) Her Majesty's Stationary Office, London v.1, i,ii, p.104-128; v.2, p.1-135, v.3, p.1-299, (bound in v.1).
- Horta, P.A.** 2002. Bases para a identificação das coralináceas não articuladas do litoral brasileiro – uma síntese do conhecimento. *Biotemas* 15: 7-44.
- Horta, P.A.; Amancio, E.; Coimbra, C. & Oliveira, E.C.** 2001. Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. *Hoehnea* 28: 243-265.
- Horta, P. A. ; Scherner, F.; Bouzoun, Z. L.; Riosmena-Rodriguez, R.& Oliveira, E. C.** 2011. Morphology and reproduction of *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Me. Lenoime (Corallinales, Rhodophyta) of Southern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 34: 125-134.
- Keats, D.W., Chamberlain, Y.M.** 1994. Two melobesioid coralline algae (Rhodophyta, Corallinales): *Mesophyllum erubescens* (Foslie) Lemoine and *Mesophyllum funafutiense* (Foslie) Verheij from Sodwana Bay, South Africa. *South African Journal of Botany* 60:175-190.
- Keats, D.W. & Maneveldt, G.** 1997. First report of the melobesioid alga (Corallinales, Rhodophyta) *Mesophyllum incisum* (Foslie) Adey in South Africa. *South African Journal of Botany* 63: 201-209.
- Lemoine, Me.P.** 1928. Un nouveau genre de Mélobésiées: *Mesophyllum*. *Bulletin Société Botanique de France* 75:251-254.
- Lebednik, P.A.** 1978. Development of male conceptacles in *Mesophyllum* Lemoine and other genera of the Corallinaceae (Rhodophyta). *Phycologia* 17: 388-395.

- Moura, R.L.; Francini-Filho, R.B.; Menezes, N.A.; Dutra, G.F.; Cappell, D. & Comin, E.L. 2003. Memorial Descritivo do Meio Marinho da Ilha da Queimada Grande e Proposta de Ampliação e Alteração da Categoria de ARIE (Área de Relevante Interesse Ecológico) para Parque Nacional. Memorial Descritivo do Meio Marinho da Ilha da Queimada Grande e Proposta de Ampliação e Recategorização da ARIE
- Murray, G. 1893. A comparison of the marine floras of the warm Atlantic, Indian Ocean and the Cape of Good Hope. *Phycological Memoirs*, London.
- Nunes, J.M.C.; Guimarães, S.M.P.B.; Donangelo, A., Farias, J. & Horta, P.A. 2008. Aspectos taxonômicos de três espécies de coralináceas não geniculadas do litoral do estado da Bahia, Brasil. *Rodriguésia* 59:75-86.
- Oliveira, E.; Österlund, K. & Mtolera, M.S.P. 2005. Marine Plants of Tanzania. A field guide to the seaweeds and seagrasses. pp. 267, Botany Department, Stockholm University.
- Ringeltaube, P. & Harvey, A. 2000. Non-geniculate coralline algae (Corallinales, Rhodophyta) on the Heron Reef, Great Barrier Reef (Australia). *Botanica Marina* 43:431-454.
- Silva, P.C.; Basson, P.W. & Moe, R.L. 1996. Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean. University of California Publications in Botany 79: 1-1259.
- Tâmega, F.T.S. & Figueiredo, M.O. 2005. Distribuição das algas calcárias incrustantes (Corallinales, Rhodophyta) em diferentes habitats na Praia do Forno, Armação dos Búzios, Rio de Janeiro. *Rodriguésia* 56:123-132.
- Townsend, R.A. 1979. *Synarthrophyton*, a new genus of Corallinaceae (Crytonemiales, Rhodophyta) from the southern hemisphere. *Journal of Phycology* 15: 251-259.
- Wilks K.M. & Woelkerling, W.J. 1995. An account of Southern Australian species of *Lithothamnion* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany* 8: 549-583.
- Woelkerling, W.J. 1988. The Coralline red algae: An analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate corallinaceae. *British Museum (Natural History) and Oxford University Press*: London e Oxford.

- Woelkerling, W.J. & Harvey, A. 1993. An account of southern Australian species of *Mesophyllum* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany* 6: 571-637.
- Wynne, M.J. 2005. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision, *Nova Hedwigia* 129: 1-152.